

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Zentrum der Morphologie  
(Dr. Senckenbergische Anatomie)  
Institut der Anatomie III  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Stehle

## **Der Neokortex der Säugetiere – Evolution und Funktion**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Alexander Kern  
aus München

Frankfurt am Main, 2011

Dekan:	Prof. Dr. med. Josef M. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. Helmut A. Oelschläger
Korreferent:	Prof. Dr. med. Karl H. Plate
2. Korreferent:	Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wolf Singer
Tag der mündlichen Prüfung:	30. April 2012

**Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet**

***Wenn uns die Struktur nichts über die Funktion sagt, bedeutet dies,  
dass wir sie nicht richtig betrachtet haben.***

Albert von Szent-Györgyi (1893-1986)

Nobelpreis in Physiologie oder Medizin 1936



## Inhaltsverzeichnis:

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Gehirn als Spiegelbild der Umwelt	1
1.2	Die quantitative Entwicklung des Gehirns und der Hirnrinde bei Säugetieren	4
1.3	Die Bedeutung des phylogenetischen Hintergrundes	9
1.4	Der Zusammenhang von sozialer Lebensweise und neokortikaler Komplexität	11
1.5	Struktur und Funktion des Neokortex - die Grundlagen	14
<b>2</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>24</b>
2.1	Zur Systematik der untersuchten Säugetiere	24
2.2	Charakteristika der untersuchten Spezies	24
2.3	Die Bearbeitung der Kortexproben	27
2.3.1	Probenentnahme	27
2.3.2	Fixation des Gewebes	29
2.3.3	Kryoprotektion und Schneiden	29
2.3.4	Die klassischen Färbemethoden	30
2.3.5	Immunhistochemie	32
2.4	Die histologische Feinanalyse des Kortexmaterials	38
2.4.1	Schichtengliederung und Zellmorphologie	38
2.4.2	Design-basierte Stereologie	39
2.4.2.1	Methodische Voraussetzungen	40
2.4.2.2	Bestimmung der Neuronenzahl mit dem „Optical Fractionator“	43
2.4.2.3	Bestimmung des Gewebevolumentums mit der „Cavalieri Probe“	52
2.5	Technische Ausrüstung	57
2.5.1	Mikroskope und Kameras	57
2.5.2	Bildbearbeitungs-Software	58
2.5.3	Stereologie-Software	58
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
3.1	Vergleich der primären Rindenfelder im Nissl-Zellbild	59
3.1.1	Motorisches Areal (M1, Brodmann-Areal 4)	60
3.1.2	Somatosensibles Areal (S1, Brodmann-Areal 3)	62
3.1.3	Auditorisches Areal (A1, Brodmann-Areal 41)	63
3.1.4	Visuelles Areal (V1, Brodmann-Areal 17)	66
3.2	Die primären Rindenfelder verschiedener Zahnwale im Nissl-Zellbild	68
3.2.1	La-Plata-Delphin ( <i>Pontoporia blainvillei</i> )	69
3.2.2	Glattschweinswal ( <i>Neophocaena phocaenoides</i> )	70
3.2.3	Amazonasdelphin ( <i>Inia geoffrensis</i> )	71
3.2.4	Gemeiner Delphin ( <i>Delphinus delphis</i> )	74
3.2.5	Großer Tümmler ( <i>Tursiops truncatus</i> )	75
3.3	Die primären Rindenfelder bei Huftier, Raubtier und Primaten in der Nissl-Färbung	77
3.3.1	Hausschwein ( <i>Sus scrofa f. domestica</i> )	78
3.3.2	Schaf ( <i>Ovis ammon f. domestica</i> )	79
3.3.3	Hund ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	81
3.3.4	Gorilla ( <i>Gorilla gorilla</i> )	82

3.3.5	Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )	85
3.4	Charakteristika der kortikalen Neuronen bei Zahnwalen am Beispiel des Schweinswals (Rapid-Golgi-Imprägnation)	86
3.4.1	Pyramidenzellen	90
3.4.2	Nicht-Pyramidenzellen	94
3.5	Immunhistochemische Analyse der primären Rindenfelder bei Spezies von Zahnwalen, Huftieren, einem Raubtier und Primaten	99
3.5.1	Anti-Calbindin	100
3.5.2	Anti-Calretinin	107
3.5.3	Anti-Parvalbumin	115
3.5.4	Anti-Neurofilament	124
3.6	Stereologie: Die Neuronendichte der Schichten III und V in den Rindenarealen M1, S1, A1 und V1 bei Zahnwalen	132
3.6.1	Schweinswal ( <i>Phocoena phocoena</i> )	132
3.6.2	Großer Tümmler ( <i>Tursiops truncatus</i> )	136
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>142</b>
4.1	Der Vergleich von Kortex-Arealen	142
4.2	Der Vergleich von Delphinarten vor dem Hintergrund der Säugetiere	143
4.2.1	Der kortikale Grundbauplan im Nissl-Zellbild und seine Abwandlung in verschiedenen Säugetiergruppen	144
4.2.2	Zelltypen im Neokortex des Schweinswals	150
4.2.3	Die immunhistochemische Analyse des Kortex	152
4.2.4	Stereologische Analyse des Zahnwal- Kortex: Erkenntnisse zur Zelldichte beim Schweinswal und beim Großen Tümmler	158
4.3	Funktionelle Implikationen	161
4.3.1	Der Bauplan des Säugetierkortex	161
4.3.1.1	Der thalamische Input	163
4.3.1.2	Die intrinsische Verschaltung	173
4.3.1.3	Der kortikale Output	182
4.4	<i>Primaten und Delphine</i> : Zur vergleichenden Evolutionsbiologie und Funktionalität des Neokortex bei zwei "Extremformen" von Säugetieren	193
4.5	Die Kortex-Morphologie und - Funktion bei Säugetieren: Fazit und Ausblick	207
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>211</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>214</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>217</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>237</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf und Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>239</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>242</b>
10.1	Liste der verwendeten Materialien	242
10.2	Liste der verwendeten Reagenzien	243
10.3	Rezepte	246

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Gehirn als Spiegelbild der Umwelt

*"Natural selection appears to have been so pervasive as to allow us to infer important ecological and behavioural attributes of a mammal from multivariate knowledge of its brain proportions alone"* (de Winter und Oxnard, 2001)

Diese etwas frei übersetzte Metapher des Gehirns als einer Art Spiegelbild der ökologischen Nische und des Verhaltens eines Säugetiers trifft auf das hier bearbeitete Thema in besonderer Weise zu, denn das Zentralnervensystem setzt sich ja als eine Art "Interface" verzögerungsarm mit seiner Peripherie im Körper und über die Sinne mit der Umgebung eines Individuums auseinander. Dabei erhält das Gehirn nicht nur dessen Homöostase aufrecht, sondern ist für das Überleben der betreffenden Art von entscheidender Bedeutung. Auf diese Weise befindet sich das Gehirn in einer "Schicksalsgemeinschaft" mit dem Lebensraum der jeweiligen Spezies und ist daher längerfristig gezwungen, sich mit dieser zu ändern, um sich immer wieder an neue Verhältnisse anzupassen. Bei Beachtung dieser Zusammenhänge ist es dem Hirnforscher indirekt möglich, aus den Strukturen und Musterbildungen in Hirngewebe nicht nur deren Funktion, sondern (in gewissen Grenzen) auch deren Evolution zu rekonstruieren (Baron 2007; Oelschläger und Oelschläger 2009).

Aus diesen Prämissen folgt aber auch, dass beispielsweise Säugetiergruppen, welche dramatische Lebensraumwechsel durchgemacht haben, besonders tiefgreifende Änderungen im Bau des Gehirns aufweisen. All dies lässt sich an ursprünglichen Säugetieren abschätzen (basale Insektivoren; Stephan 1967; Stephan et al. 1981; Stephan 1983), welche als eine Art "Null-Linie" angesehen werden können, da sie sich offenbar über lange Zeiträume hinweg in ihren ökologischen Nischen relativ wenig verändert haben, ganz im Gegensatz beispielsweise zu unseren nächsten Verwandten, den Primaten, deren Erfolgsgeschichte aus der sogenannten "aufsteigenden Primatenreihe" (Stephan und Andy 1969, 1970; Baron 2007) eindrucksvoll zutage tritt.

Aber auch bei anderen Säugetieren ist das Gehirn vergleichsweise gut entwickelt, wobei sich allgemein-gültige Korrelationen herausgebildet haben. So ist es innerhalb von Säugetiergruppen bei der Zunahme der Körpermasse auch zu einer Zunahme

der Hirnmasse (Encephalisation, Cerebralisation) gekommen, wobei das Gehirn langsamer wächst als der Körper (Manger 2006). Dabei vergrößert sich das Endhirn besonders stark (Telencephalisation). Das quasi "modernste" Hirnareal ist die Hirnrinde, genauer die Endhirn- bzw. Neuhirnrinde (Neokortex), welche sich als übergeordnetes Gebiet bei Lern- und Regenerationsprozessen besonders plastisch verhält und das übrige Gehirn durch die Entwicklung neuer Bahnen stark überprägt. Der zugehörige Begriff "*Neencephalisation*" (von griechisch "neos": neu) wurde von dem bedeutenden Frankfurter Neurologen und Neuroanatomen Ludwig Edinger geprägt. Er besagt, dass das Fortschreiten der Hirnentwicklung, speziell der Telencephalisation, durch die Ausbildung neuer und phylogenetisch gesehen "jüngerer" Hirnareale dominiert wird (Edinger 1908). Aus der Sicht der Entwicklungsgeschichte lässt sich in diesem Zusammenhang feststellen, dass gerade der zuletzt ausgeformte, an der Oberfläche gelegene Endhirnmantel (lateinisch: "pallium") relativ und absolut gesehen das auffälligste Größenwachstum durchläuft. Alfred S. Romer und Thomas S. Parsons stellten darauf aufbauend fest, dass die Hirnevolution bei den verschiedenen Säugetiergruppen vornehmlich auf der spezifischen Ausdehnung und Abwandlung des Neopalliums, also des zuletzt entwickelten, jungen Endhirnmantels beruht (Romer und Parsons 1977).

Wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer zunehmenden Spezialisierung des Neopalliums bei der Repräsentation der Körperoberfläche bzw. der Sinnesorgane sowie mit der Entstehung neuer Areale für die Verknüpfung dieser Sinnesendstellen, kam es offenbar zu einer starken Zunahme der Oberfläche und damit zur mehr oder minder ausgeprägten Faltung des Palliums, d.h. einer Kortikalisation bzw. Neokortikalisation. Als Vorreiter bei der Erforschung u.a. dieser quantitativ/qualitativen Phänomene können Heinz Stephan (Frankfurt a.M.) und Orlando J. Andy gelten. In einer ihrer grundlegenden Arbeiten liefern die beiden Autoren eindrucksvolle Ergebnisse: Entlang der "aufsteigenden Primatenreihe", welche in den meist als ursprünglich (plesiomorph) angesehenen, manchmal auch abwertend als "primitiv" geltenden Insektenfressern fußt (Insektivoren, z.B. Igel, Tenrek) und sich über Halbaffen (Prosimier, z.B. Lemuren), Affen (Simier, z.B. Gibbon) sowie die Menschenaffen (Hominiden, z.B. Schimpanse, Gorilla) bis hin zum hoch abgeleiteten Menschen (*Homo sapiens*) fortsetzt, nimmt die relative (auf das Resthirn bezogene) Größe des Neokortex proportional stetig zu (Stephan und Andy 1970).

Das Phänomen der „*Neokortikalisierung*“ ist speziell bei Hominiden und dem Menschen zumindest quantitativ gesehen besonders ausgeprägt und lässt gewisse Rückschlüsse über die Höhe der Hirnentwicklung (*Cerebralisationshöhe*) innerhalb der Säugetiere zu. Gewissermaßen als den Gipfel der Rindenentwicklung führt John C. Eccles als phylogenetisch gesehen jüngste Errungenschaft der Hirnevolution den Begriff des „*Neo-Neokortex*“ ein (Eccles 1989). Die darin enthaltenen Rindenregionen finden sich ausschließlich bei Menschenaffen sowie dem Menschen selbst. Sie sind nicht nur stammesgeschichtlich als Endpunkt der bisherigen Kortex-Evolution anzusehen, sondern entstehen in der Entwicklung (Ontogenese) des einzelnen Individuums ebenfalls zuletzt.

Diese neo-neokortikalen Areale (Eccles) sind im Vergleich mit anderen Rindenregionen charakterisiert durch

1) ihre späte und auf Hominiden beschränkte Entwicklung, 2) eine verzögerte Ummantelung (Myelinisierung) von Zellfortsätzen (Axone) sowie eine späte Ausreifung von Zellkontakten (Synapsen), 3) die asymmetrische Lage bestimmter Rindenareale bzw. -funktionen (Lateralisation) sowie 4) ein hohes Maß an Regenerationsfähigkeit und Plastizität vor allem nach frühen, zumeist kindlichen Schädigungen. Darüber hinaus sei als 5) angemerkt, dass mit der Aktivierung dieser Rindenfelder eine Vielzahl gnostischer (von griechisch „gnosis“: Erkenntnis) und kognitiver Funktionen verknüpft sind: Bewusstsein, Denken, Erinnerungen, Gefühle, Vorstellungen und schöpferisches Handeln. Als Beispiel für neo-neokortikale Regionen führt Eccles neben Bereichen im mittleren Präfrontallappen und im unteren Temporallappen u.a. auch die Brodmann-Felder 39 und 40 an (s.u. und Abb. 1.5-2; Eccles 1989).

Mit Blick auf John C. Eccles' Idee von einem krönenden "Abschluss" der Kortex-entwicklung innerhalb der Primaten stellt sich natürlich die Frage nach den Schlüsselmerkmalen und damit den zugrundeliegenden Mechanismen in der Evolution bis hin zum Menschen. Nicht zuletzt ist dabei von zentraler Bedeutung, inwieweit die absolute Größe des Neokortex an sich Aufschluss geben kann über so problematische Begriffe wie "Intelligenz" und cerebrale "Hierarchie/Überlegenheit" (Eccles 1989; Huggenberger 2008).

## 1.2 Die quantitative Entwicklung des Gehirns und der Hirnrinde bei Säugetieren

Die Frage nach der Entwicklungshöhe eines Säugetiergehirns betrifft nach den obigen Erläuterungen neben der Ausprägung des Gesamtgehirns (*Encephalisation*, *Cerebralisation*) immer auch die Art und Ausbildung der zugehörigen Großhirnrinde (*Kortikalisation*). Im Folgenden werden der Einfachheit halber die Begriffe Großhirnrinde und Neokortex gleichgesetzt (wegen dessen dominierender Größe), obwohl streng genommen neben dem stammesgeschichtlich jungen Neokortex auch phylogenetisch ältere und vergleichsweise recht kleine Rindenanteile wie der Paläokortex (hauptsächlich Rindengebiet des Riechsystems) und der Archikortex (hauptsächlich Rindengebiet des limbischen Systems) zur Hirnrinde gerechnet werden.

Betrachtet man bei den unterschiedlichsten Säugetieren die jeweilige relative, also auf die Körpermasse bezogene Hirnmasse, so wird deutlich, dass diese mit zunehmender Körpermasse abnimmt. Dieses Phänomen wird als „*negative Allometrie*“ oder *Regression* bezeichnet (Schwerdtfeger et al. 1984; Oelschläger und Oelschläger 2002; Poth et al. 2005; Roth und Dicke 2005; Oelschläger 2008). Trägt man nun die Daten der Hirn- und Körpermasse einiger repräsentativer Säugetiere in einem doppelt-logarithmischen Diagramm gegeneinander auf, ergibt sich folgendes Bild:

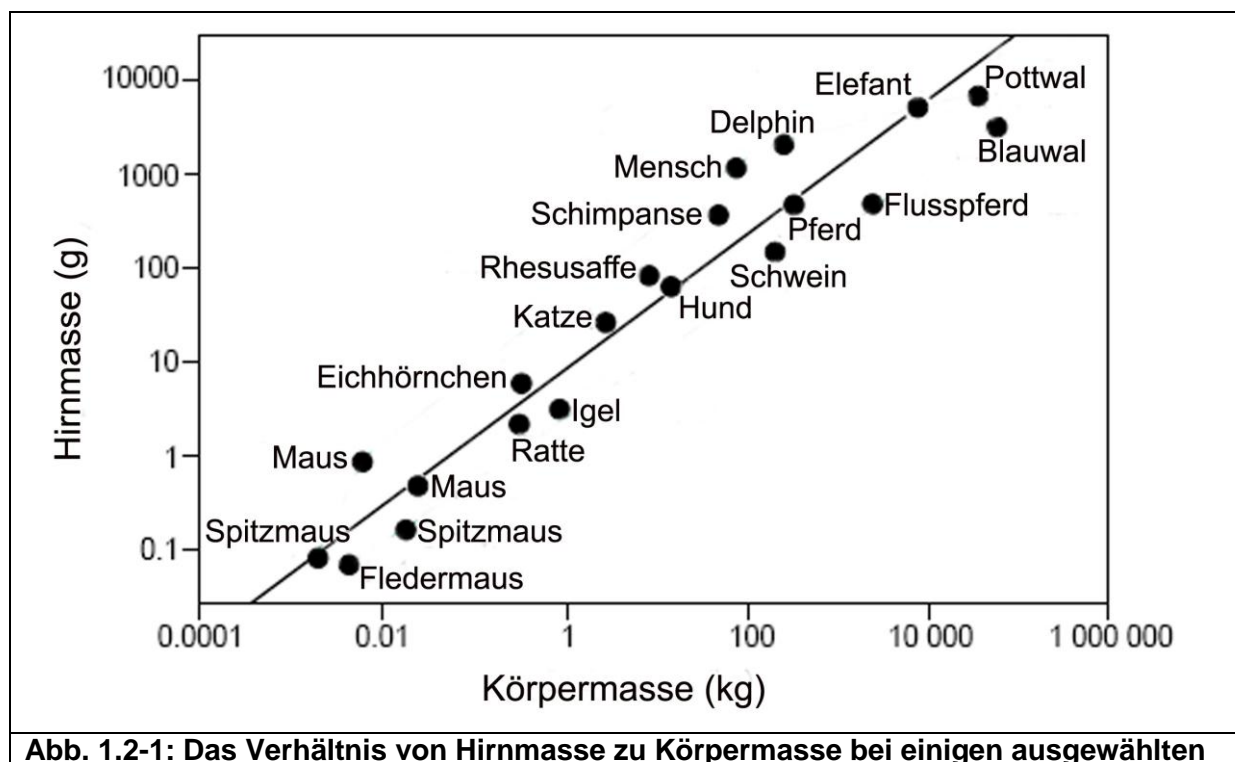


Abb. 1.2-1: Das Verhältnis von Hirnmasse zu Körpermasse bei einigen ausgewählten

### **Säugetieren in doppelt-logarithmischer Darstellung.**

Bei zunehmendem Körpergewicht nimmt das Hirngewicht relativ gesehen ab (negative Allometrie). Die Regressionsgerade ist als schwarze Linie dargestellt. Der Regressionskoeffizient dieser mathematischen Funktion beträgt 0,67. Tierarten, deren Wert für die Hirn-Körpermasse-Relation auf der Regressionsgeraden liegt, haben eine für ihre Körpergröße theoretisch zu erwartende Hirngröße. Spezies, deren Werte über bzw. unter der Regressionsgeraden liegen, haben eine für ihre Körpermasse über- bzw. unterdurchschnittliche Hirnmasse. Der Quotient aus a) dem "Ist-Wert" einer Spezies (schwarzer dicker Punkt im Diagramm) auf der Ordinate und b) dem zur Spezies gehörigen "Soll-Wert" auf der Regressionsgeraden (zum Ist-Wert vertikal versetzt, ebenfalls auf der Ordinate) ergibt den *Encephalisationindex*. Er steht für das Ausmaß der Über- bzw. Unterdurchschnittlichkeit einer Hirngröße bei entsprechender Körpermasse. Bei Maus und Spitzmaus wurden jeweils zwei unterschiedliche Stämme untersucht. Beachte die weit über dem Erwartungshorizont (Regressionsgerade) liegenden Werte speziell für den Menschen und den Delphin.

Modifiziert nach Roth und Dicke (2005).

Das Diagramm (Abb. 1.2-1) bildet die Beziehung zwischen Hirn- und Körpermasse bei einer Vielzahl von Spezies aus den unterschiedlichsten Säugetierordnungen ab: den Insektenfressern (Insektivora: Spitzmaus, Igel), einer nicht-spezifizierten Fledermaus, den Nagetieren (Rodentia: Maus, Ratte und Eichhörnchen), den Raubtieren (Carnivora: Katze, Hund), den Paarhufern (Artiodactyla: Schwein, Flusspferd), den Unpaarhufern (Perissodactyla: Pferd), sowie den Primaten (Rhesusaffe, Schimpanse und Mensch), den Walen (Cetacea: Delphin, Pottwal und Blauwal) und den Rüsseltieren (Proboscidea: Elefant).

Zum einen wird deutlich, dass die Beziehung zwischen Hirn- und Körpermasse mit einem mathematischen Ausdruck beschrieben werden kann. Dieser Erwartungshorizont ergibt sich in der doppelt-logarithmischen Darstellung als Regressionsgerade mit einer charakteristischen Steigung. Tierarten, deren Werte auf der Regressionsgeraden liegen, weisen ein für ihr Körpergewicht theoretisch zu erwartendes Hirngewicht auf (s. Abb. 1.2-1).

Besonders interessant ist die Tatsache, dass eine Vielzahl der Spezies von diesem Erwartungshorizont mehr oder minder stark abweicht. Zwar lassen sich Gehirne als biologische Strukturen im Hinblick auf ihre quantitative und qualitative Wertigkeit mit den Methoden der Mathematik bislang nur unvollständig erfassen. Allerdings legen mehr oder minder deutliche Abweichungen einiger Werte von der Regressionsgeraden die Vermutung nahe, dass bei manchen Tieren die Hirnentwicklung überdurchschnittlich (Abweichung des Werts nach oben) oder unterdurchschnittlich ist (Abweichung des Werts nach unten). Der Betrag der Abweichung wird allgemein als *Encephalisationsindex* (*EI*) oder

*Encephalisationsquotient* (EQ; Abb. 1.2-1 ) bezeichnet (Jerison 1973, 1982; Ridgway und Brownson 1984; Schwerdtfeger et al. 1984; Marino 1995, 1998; Glezer 2002; Marino 2002; Marino et al. 2004; Hof et al. 2005; Roth und Dicke 2005; Baron 2007; Reep et al. 2007). Ein EI-Wert = 1 bedeutet, dass eine Spezies innerhalb ihrer Gruppe (Taxon) eine exakt für ihre Körpermasse zu erwartende Hirnmasse aufweist. Bei all diesen Überlegungen sollte allerdings berücksichtigt werden, dass im Sinne einer optimalen Aussagekraft der gewonnenen Daten streng genommen nur gleich große Säugetiere miteinander verglichen werden sollten, d.h. in Abb. 1.2-1 am besten vertikal übereinander liegende Wertepunkte.

Insgesamt gesehen scheinen die Abweichungen in der Hirngröße bei großen Primaten und maximal großen Säugetieren besonders stark zu sein, und zwar von der Regressionsgeraden nach oben und nach unten. Dabei kommt der Delphin (Schwarzdelphin, *Lagenorhynchus obscurus*) dem Menschen ziemlich nahe. Der Elefant liegt genau auf der Regressionsgeraden, während das Flusspferd und die größten Säugetiere (Pottwal, Blauwal) offenbar deutlich schwächer enzephalisiert sind. \* (Fußnote s.u.)

Bei einer genaueren Betrachtung der Tiere im Größenbereich des Menschen fällt auf, dass seine Hirnmasse maximal über der Regressionsgeraden liegt. Die beste Übereinstimmung besteht mit dem Delphin, welcher sowohl eine höhere Körpermasse als auch eine höhere Hirnmasse aufweist, aber dennoch einen etwas geringeren Enzephalisationsquotienten. Dagegen fallen der Schimpanse und der Rhesusaffe hinsichtlich des EQ zunehmend deutlicher ab.

Hinsichtlich des Delphins wirkt dieses Resultat einigermaßen überraschend, im Gegensatz zu den großen Waltieren, bei denen allerdings die gigantische Masse des Körpers das maximal große Gehirn in die relative Bedeutungslosigkeit zwingt (Oelschläger et al. 2010). Und auch hinsichtlich seiner Kortikalisation, also der absoluten und relativen Masse der Endhirnrinde stellt der Delphin eine Parallele zur Situation beim Menschen dar. Die folgende Tabelle gibt interessante Befunde zur Enzephalisation und Kortikalisation einiger ausgewählter Säuger wieder (in Tab. 1.2-1 handelt es sich als Vertreter der Delphine um den Flaschennasendelphin oder Großen Tümmler, *Tursiops truncatus*). Für die Berechnung des Gesamtkortex wurden Paläo-, Archi- und Neokortex zusammengefasst.



**Fußnote:** \*Trotzdem besitzen diese Spezies absolut gesehen die größten Gehirne überhaupt: der Elefant mit 4700 g Hirnmasse (HM) bei bis zu 5 t Körpermasse (KM), s. Abb. 1.2-1 (Russell 1979); der Pottwal mit bis zu 9200 g HM bei 35 -50 t KM (Oelschläger und Kemp 1998; Hof et al. 2005); der Blauwal mit bis zu 6923 g HM bei 100 t KM (Slijper 1979).

**Tab. 1.2-1** Quantitative Daten zu verschiedenen Säugetiergehirnen

Spezies	Körpermasse (kg)	Hirnmasse (g)	EI	Anteil Neo- / Gesamtkortex (%)
Igel ( <i>Erinaceus europaeus</i> )	0,86 <sup>C)</sup>	3,4 <sup>C)</sup>	0,3 <sup>B)</sup>	32,4 <sup>A)</sup>
Hund ( <i>Canis lupus</i> ) *	13,43 <sup>B)</sup>	64,0 <sup>B)</sup>	1,2 <sup>B)</sup>	84,5 <sup>A)</sup>
Delphin ( <i>Tursiops truncatus</i> )	209,53 <sup>D)</sup>	1735,0 <sup>B)</sup>	5,3 <sup>B)</sup>	97,8 <sup>A)</sup>
Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )	65,00 <sup>C)</sup>	1444,0 <sup>B)</sup>	7,4 <sup>B)</sup>	95,9 <sup>A)</sup>
Quelle der Daten: A) Preobrashenskaja et al. 1973; B) Russell 1979; C) Stephan 1981; D) Hof et al. 2005; * Haushund ( <i>Canis lupus familiaris</i> ). Abkürzungen: EI: Enzephalisationsindex.				

Die in Tab. 1.2-1 aufgeführten Säugetiere sind nach ihrem aufsteigenden Enzephalisationsindex angeordnet, während die Parameter Hirnmasse und prozentualer Anteil des Neokortex am Gesamtkortex beim Menschen wieder abnehmen.

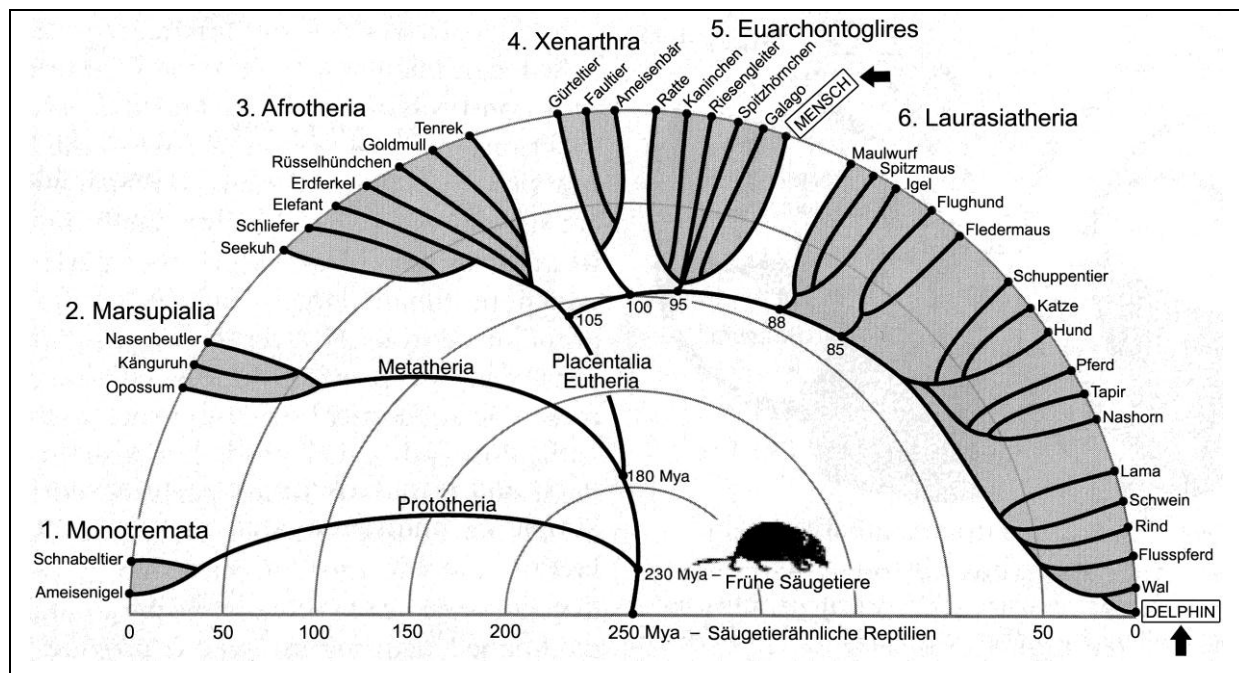
Der Igel bzw. die Insectivora insgesamt werden bei quantitativen Analysen gerne als Basispunkt oder Null-Linie verwendet. Deutlich höhere Werte zeigen Hund und Delphin. Der Mensch weist eine kleinere Körpermasse und Hirnmasse auf als der Delphin, aber trotzdem ein Maximum an Enzephalisation EI (7,4), d.h. an Hirnmasse pro Körpermasse. Hinsichtlich des prozentualen Anteils des Neokortex insgesamt (Rindengrau und Album) am Gesamtgehirn zeigen höhere Primaten (Simiae oder Anthropeidea) und Zahnwale (Odontoceti) ähnliche Werte (70.22 vs. 72.14 %; Manger 2006), doch gibt es deutliche Unterschiede zwischen *Homo sapiens* (84,02 %) und *Tursiops truncatus* (72,89 %). Formal gesehen ist die Telencephalisation beim Menschen also weiter fortgeschritten als beim Flaschennasendelphin. Deutliche Unterschiede gibt es auch im Anteil des Rindengraus allein am Gesamtthirn; auch hier steht der Mensch höher als der Delphin (49,17 vs. 41,41 %; Manger 2006): der

Delphin besitzt also ein dünneres Rindengrau bei einer erheblich größeren Rindenoberfläche und einen höheren Anteil an weisser Substanz. Hinsichtlich des prozentualen Anteils des Neokortex (Isokortex) am Gesamtkortex wird der Mensch dagegen vom Delphin knapp übertroffen (95,9% vs. 97,8%; s. Tab. 1.2-1), was mit dem etwas geringer entwickelten Allocortex (also Paläo- und Archikortex) bei Cetaceen zusammenhängt.

All diese Daten und der Vergleich mit der Hirnrinde bei anderen terrestrischen Säugetieren legen die Vermutung nahe, dass der Neokortex innerhalb der Zahnwale (Delphine) eine spezifische Abwandlung durchgemacht hat. Dabei wurde offenbar ein solcher Grad an quantitativer Entfaltung des Kortex erreicht, dass seine absolute und relative Größe innerhalb des Gesamthirns im Hinblick auf Volumen bzw. Oberfläche weitgehend der Situation bei den Primaten entspricht. Da es sich bei den zugrundeliegenden Ursachen hierfür größtenteils um Parallelphänomene in diametral andersartigen Lebensräumen handeln dürfte, scheint es lohnend, vor dem Hintergrund der Landsäugetiere vor allem die Hirnrinde der Zahnwale und der Primaten miteinander zu vergleichen. Als das bei beiden Gruppen herausragende analoge Phänomen ist hier vor allem die Hirngröße mit ihren Maxima beim Delphin und beim Menschen zu sehen. Hinter diesen und anderen erstaunlichen quantitativen Übereinstimmungen stehen vermutlich stark divergierende Anpassungsmechanismen. Ihre Erforschung dürfte quasi "im Lichte der wechselseitigen Erhellung" grundsätzliche Erkenntnisse über die Evolution und Funktion des Neokortex bei Säugetieren allgemein und beim Menschen speziell erbringen. Dabei scheint erstens von Vorteil, dass der Neokortex mit seinem hohen Differenzierungsgrad als Ort der "intellektuellen" Auseinandersetzung des Individuums mit seiner Umwelt und damit als hochkomplexer Merkmalsträger für eine solche morphologisch-funktionelle Analyse gelten kann. Zweitens wird bei diesem Verfahren indirekt auch die Stellung des Menschen innerhalb der Säugetiere beleuchtet, und seine herausragenden Kortex-Charakteristika werden einer kritischen Prüfung unterzogen (s.u.).

### 1.3 Die Bedeutung des phylogenetischen Hintergrundes

Um die stammesgeschichtlichen Zusammenhänge der hier berücksichtigten Säugetierarten, vor allem auch von Mensch und Delphin, besser verstehen zu können, ist der folgende Abschnitt einem kurzen Blick auf den Stammbaum der Säugetiere gewidmet (Abb. 1.3-1).



**Abb. 1.3-1: Der Stammbaum der Säugetiere.**

Die Entwicklung der Säugetiere aus einem Reptilien- Vorläufer beginnt vor ca. 250 Mio. Jahren (Mya). Daraus entwickelten sich die drei großen Unterklassen: Ursäuger (Prototheria), Beutelsäuger (Metatheria) und höhere Säugetiere (Eutheria oder Placentalia). Hierarchisch weiter untergliedert ergeben sich sechs Überordnungen (Nr. 1-6). Aus dem Zweig der Ursäuger entstammen die heutigen Kloakentiere (Nr. 1, Monotremata), aus dem Ast der Beutelsäuger die heutigen Beuteltiere (Nr. 2, Marsupialia) und aus der Abzweigung der höheren Säugetiere die Überordnungen der aus Afrika stammenden Säugetiere (Nr. 3, Afrotheria), der Nebengelenktiere (Nr. 4, Xenarthra), der Euarchontoglires (Nr. 5, syn. Supraprimates) sowie den vom ehemaligen Großkontinent Laurasia stammenden Säugetieren (Nr. 6, Laurasiatheria).

Beachte die Position von Mensch und Delphin (jeweils umrandet und durch einen schwarzen Pfeil markiert) innerhalb des Stammbaums.

Modifiziert nach Murphy et al. (2004).

Die Entwicklungslinie der Primaten (und damit auch des Menschen) hat vor ca. 80 Mio. Jahren begonnen (Eccles 1989). Die Vorfahren der Cetacea (Wale und Delphine) haben sich dagegen erst vor etwas mehr als 50 Mio. Jahren von ihren nächsten Verwandten abgespalten (Thewissen und Williams 2002; Geisler und Theodor 2009). Diese nächsten Verwandten der Cetaceen, die Paarhufer (Artiodactyla: v.a. Schwein und Flusspferd), stellen daher phylogenetisch betrachtet

die Schwestergruppe der Cetacea dar. Die Bezeichnung "Cetartiodactyla" trägt dieser nahen Verwandtschaft Rechnung (Boisserie et al. 2005). Innerhalb der Wale und Delphine haben sich später zwei Stammlinien als Unterordnungen herausgebildet: einerseits die Bartenwale (Mysticeti) und zum anderen die Zahnwale (Odontoceti). Bemerkenswert ist hier, dass sich die beiden Unterordnungen (bei allen Gemeinsamkeiten) in Anpassung an stark unterschiedliche Lebensweisen grundsätzlich voneinander unterscheiden: die heutigen adulten Bartenwale besitzen in ihren Kiefern keine Zähne mehr, sondern lediglich Hornplatten (Barten) mit deren Hilfe sie Krill und anderes Plankton aus dem Meer filtrieren (Bowen et al. 2002). Vertreter dieser Unterordnung sind vor allem die großen Wale wie beispielsweise der Buckelwal und der Blauwal. Die Zahnwale dagegen tragen in ihren Kiefern noch immer Zähne und agieren als Jäger. Zu ihrer Beute zählen neben Fischen und Tintenfischen teilweise auch andere Meeressäuger wie z.B. Robben, im Extrem (Schwertwal) auch große Bartenwale. Als Vertreter der Zahnwale gelten z.B. der Große Tümmler (syn. Flaschnenasendelphin, *Tursiops truncatus*) und der Gemeine Delphin (*Delphinus delphis*). Als herausragendes Charakteristikum der Zahnwale kann ihre Fähigkeit der Echolokation auf Ultraschall-Basis gelten, welche für Bartenwale bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Dehnhardt 2002; Oelschläger und Oelschläger 2009). Weiteres hierzu wird in Kap. 1.4 genauer erläutert.

Für eine adäquate Untersuchung des Neokortex hinsichtlich seiner Struktur, Funktion und Evolution ist es von Vorteil, ein ganzes Spektrum unterschiedlicher Säugetier-Spezies heranzuziehen. Gerade der Vergleich von Extremformen miteinander erleichtert das Verständnis von den adaptiven Möglichkeiten des Gehirns in unterschiedlichen Lebensräumen. Letztere geben durch ihre physikalischen Parameter primär ein Korsett von Rahmenbedingungen vor, innerhalb dessen sich eine Spezies entfalten kann und muss. Die aus dem Spektrum von hier inspizierten Arten gewonnenen Befunde werden vor ihrem biologischen Hintergrund gegeneinander abgewogen und stellen dann in ihrer Gesamtheit ein tragfähiges Fundament für allgemeinere Aussagen zur Kortex-Evolution dar.

Als "Extremformen" innerhalb dieses Spektrums bieten sich nun zuallererst die Primaten und Zahnwale (Delphine) an. Trotz ihres diametral unterschiedlichen Lebensraumes erreichen beide Ordnungen hinsichtlich ihrer Hirn- und Kortextevolution im Tierreich sonst unerreichte Rekorde. Säugetiere mit absolut

gesehen noch größeren Gehirnen (Neokortices) sind angesichts ihrer überproportional größeren Körpermassen entsprechend geringer enzephalisiert (vgl. Kap. 1.2, s. Abb. 1.2-1). Dass aber die Menge an Gehirn pro Körpermasse eine bedeutende Rolle spielen kann, ist beim Menschen zu besichtigen. Die reine Datenlage, ohne sie überzubewerten, bringt den Delphin formal-neurobiologisch sogar in die Nähe des Menschen (siehe Tabelle 1.2-1). Dieses erstaunliche Phänomen wird im Folgenden ausführlich analysiert und diskutiert. Nun sind die beiden Säugetiergruppen (Primaten, Zahnwale) stammesgeschichtlich so weit voneinander entfernt, dass die quasi gemeinsame herausragende Hirngröße auf unterschiedliche Weise (konvergent) entstanden sein muss. Deshalb lohnt es sich, vor allem für die Zahnwale, die betreffende Vorfahrenkonstruktion als eine Art von "phylogenetischem Brückenschlag" ins Spiel zu bringen. Die Wältiere (Cetaceen) gehen, wie schon erwähnt, stammesgeschichtlich auf ausgestorbene terrestrische Paarhufer, also Vorfahren der heutigen Artiodactyla, zurück, wobei sie nach neuesten Untersuchungen den Schweineartigen, und hier vor allem den Flusspferden, nahestehen sollen; mit den Paarhufern stehen die Cetaceen daher in einem Schwestergruppenverhältnis und bilden das Taxon "Cetartiodactyla" (Boisserie et al. 2005). Infolge ihrer phyletischen Nähe zu den Cetaceen werden in der vorliegenden Arbeit daher auch die Kortizes von Paarhufern untersucht (Schwein, Schaf). Und um dem Aspekt des carnivoren Nahrungserwerbs der Zahnwale gerecht zu werden, wird in der Folge auch auf eigene Befunde an einem Land-Carnivoren (Hund) zurückgegriffen.

Für die Beantwortung der Frage, warum gerade bei Primaten und Delphinen, welche einander phyletisch gesehen vergleichsweise fernstehen, eine so außerordentliche Cerebralisation bzw. Neokortikalisierung auf analoger (konvergenter) Basis zustandekam, soll der folgende Abschnitt einen Überblick möglicher Faktoren liefern.

#### **1.4 Der Zusammenhang von sozialer Lebensweise und neokortikaler Komplexität**

Welche Selektionsdrücke letztlich eine derart ausgeprägte Kortextentwicklung wie bei Menschen und Delphinen begünstigt haben, ist bislang nicht endgültig geklärt. Interessant scheinen aber Spekulationen, die einen direkten Zusammenhang zwischen der relativen Kortextgröße einerseits sowie der Komplexität des sozialen (kommunikativen) Verhaltens innerhalb einer Gruppe andererseits postulieren.

Allgemein wird dieser Gedanke als "Hypothese der sozialen Intelligenz" (*social intelligence hypothesis*, auch *social brain hypothesis*) bezeichnet (Humphrey 1976; Oakley 1979; Dunbar 1998; Roth und Dicke 2005; Striedter 2005). In diesem Zusammenhang deklarierte David A. Oakley den Neokortex sogar zum „Organ des Sozialen“, welches für ein Individuum aufgrund der verbesserten Interaktion mit anderen Artgenossen einen klaren Überlebensvorteil bringen soll (Oakley 1979). Insgesamt beziehen sich kommunikative Signale innerhalb einer Gruppe auf zwei grundlegende Aspekte: einerseits den Zusammenhalt der Gruppe (kohäsive soziale Signale) und andererseits den Wettstreit der Gruppenmitglieder untereinander (agonistische soziale Signale; Storch et al. 2001).

Betrachtet man nun die jeweils für die Verarbeitung/das Verständnis der eingehenden Information erforderliche neurophysiologische Kapazität, zeigen sich folgende interessante Zusammenhänge:

A) Zum einen scheint bei einer bestimmten Spezies das Ausmaß dieser Kapazität mit der Obergrenze der bestehenden Gruppengröße zu korrelieren: Mit zunehmender Größe einer Gruppe, in der jeder jeden kennt, nimmt die Zahl kohäsiver und agonistischer Verhaltensweisen zwangsläufig zu. Dementsprechend muss für die Aufrechterhaltung eines sozialen Gleichgewichts innerhalb der Gruppe eine immer größer werdende Zahl an Signalen sinnvoll ausgesendet und verarbeitet werden. Diese Kapazität ist naturgemäß limitiert (Dunbar 1992; Meier und Ploog 1997).

B) Zum anderen hängt die Kapazität direkt von der Größe, d.h. der Ausdehnung des Neokortex per se ab, der die Signalverarbeitung durchführen muss. Insgesamt lässt sich deshalb schlussfolgern, dass die Komplexität der sozialen Organisation einer Gruppe (ab einem gewissen Mindestniveau) eng mit der strukturellen Ausdehnung der Großhirnrinde korreliert (Dunbar 1992; Meier und Ploog 1997; Striedter 2005).

Auch innerhalb der Hominiden inklusive des Menschen lässt sich dieser Zusammenhang erkennen (Dunbar 1998; Kudo und Dunbar 2001). Hierbei sei speziell für das folgende Beispiel ein Größenindex für die Großhirnrinde (Neokortex-Index: "NI") eingeführt, der den Grad der Ausdehnung des Neokortex wiedergibt, bezogen auf den Igel als einen basalen Insektivoren (NI=1) (nach Stephan et al. 1981; Stephan 1983).

**Tab. 1.4-1** Zusammenhang von Neokortex und Gruppengröße bei Primaten

Spezies	Neokortex-Index <sup>A)</sup> (NI)	Maximale Gruppengröße <sup>B)</sup> (Anzahl Individuen)
Gorilla ( <i>Gorilla gorilla</i> )	49,0	30-35
Schimpanse ( <i>Pan troglodytes</i> )	72,7	50-60
Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )	199,2	100-200
Quelle der Daten: A) Eccles 1989; B) Storch et al. 2001; NI ist bezogen auf die Regressionsgerade der basalen Insektivoren.		

Bei Gorillas (NI= 49,0) beträgt die maximale Gruppengröße demnach ca. 30 bis 35 Individuen, bei den dem Menschen nächstverwandten Schimpansen (NI= 72,7) ca. 50 bis 60 und beim Menschen selbst (NI= 199,2) schließlich ca. 100 bis 200 Individuen. Die Korrelation zwischen Neokortexgröße und Gruppengröße (und damit eines zunehmend komplexeren Soziallebens) lässt sich demnach bei Menschenaffen und dem Menschen gut nachvollziehen.

Inwieweit diese mutmaßliche Beziehung zwischen der Gruppengröße von Artgenossen und ihrer Neokortexentfaltung bei Primaten ohne weiteres auf Delphine übertragen werden kann, bleibt noch genauer zu klären. Bei Delphinen gibt es Hinweise auf stark variierende Gruppengrößen (400-1000 Individuen; Connor 2007; s.a. Kern et al. 2011), damit verbunden die Bildung wechselnder Allianzen je nach Erfordernis, die akustische Individualität von Delphinen (signature whistles) sowie gruppeneigene "Dialekte". Außerdem sind echte Delphine neugierig und gelten auch als Erwachsene noch als verspielt, was sie für Delphinarien interessant macht. Delphine als ausgeprägt soziale Tiere sind stark aufeinander angewiesen, ein in der Hochsee isoliertes Individuum ist seines sozialen Netzwerks beraubt und verkümmert (Würsig et al. 1994). Im täglichen Leben sind Delphinschulen stark kooperierende Einheiten, deren Mitglieder in einem lebenslangen "Katz- und- Maus- Spiel" (Würsig et al. 1994) mit ihren Fressfeinden durch flexibles Verhalten und stetige Wachsamkeit in der Gruppe bestehen müssen - in einem für ehemalige Landsäugetiere hochkomplexen und „schwierigen“ Lebensraum (Kern et al. 2009). Im übrigen zeigen Hochsee-Delphine auch eine Reihe von sozialen Merkmalen, die für andere „hochentwickelte“ Säugetiere typisch sind. So sind neben Elefanten und Primaten (inklusive des Menschen) auch Delphine für die Fähigkeit zur

Selbsterkennung des eigenen Spiegelbildes bekannt sowie für eine recht lange Tragzeit samt geringer Nachkommenzahl mit einer daraufhin teils elterlichen/ teils von „Tanten“ (alloparental) übernommenen Fürsorgezeit für die Nachkommen (jeweils nachgewiesen beim Großen Tümmler; Wirz 1954; Marino 2002, 2004; Sakai et al. 2006; Connor 2007). All diese Fähigkeiten und Eigenschaften mögen dazu beigetragen haben, dass Delphine im Laufe ihrer Evolution wie die Primaten (bei allen Unterschieden im Detail) ein großes bis sehr großes Gehirn mit einem vergleichbar stark entfalteten Neokortex entwickelt haben (s.a. Huggenberger 2008). Deshalb scheint es sinnvoll, für eine Analyse des Baus und der Funktion des Kortex allgemein (unter Einbeziehung weiterer Säugetier-Spezies) auf die Situation bei den Primaten und den Zahnwalen zu fokussieren (Dunbar 1998; Marino 2002; Roth und Dicke 2005; Connor 2007; Huggenberger 2008).

Trotz alledem lassen sich die Delphine hinsichtlich ihrer Hirngröße durch die genannten, mit anderen Säugetieren geteilten Verhaltensmerkmale nicht hinreichend verstehen. Auf diese Fragestellung wird im weiteren Verlauf der Arbeit genauer eingegangen. Und dennoch scheinen all die oben erwähnten "kognitiven" Fähigkeiten letzten Endes das Produkt einer einzigartigen Entwicklung widerzuspiegeln: der Evolution des Neokortex.

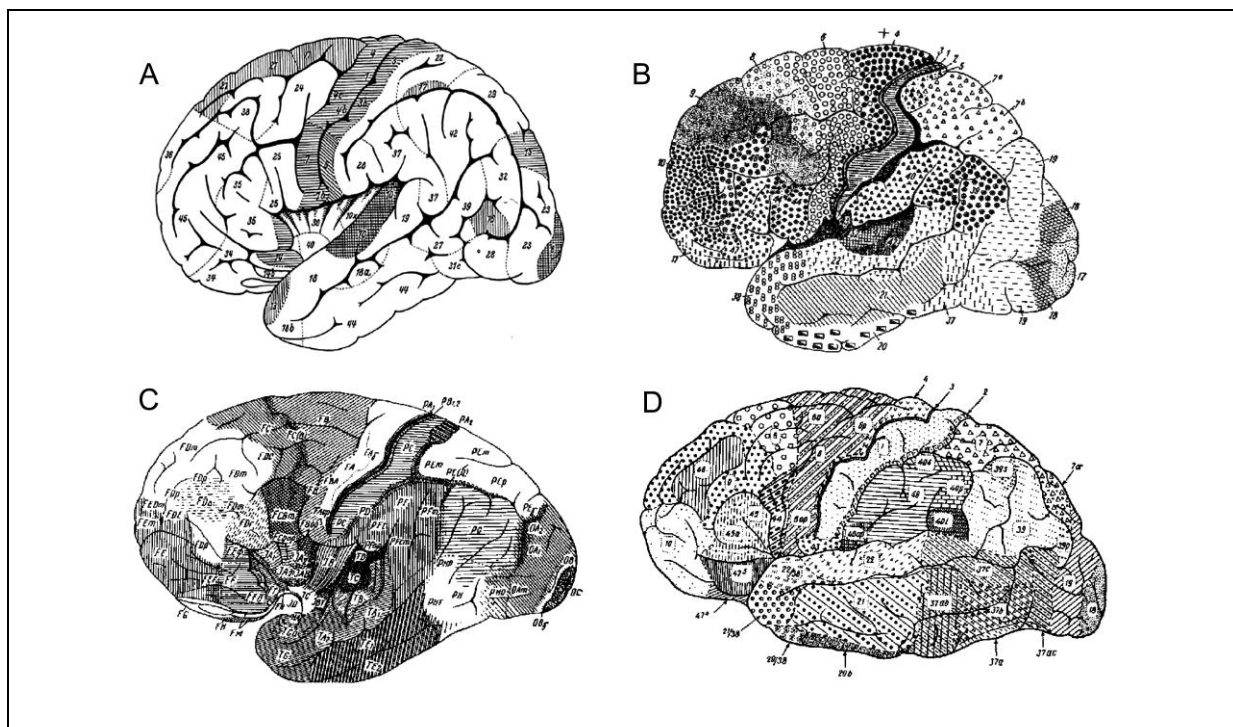
Im Folgenden sind für das hier vorgestellte Forschungsprojekt die primären neokortikalen Projektionsareale als die "Sinnesendstellen" der afferenten Systeme (S1, A1, V1) sowie das übergeordnete motorische Rindenfeld (M1) von besonderem Interesse. Sie gehören zu der kortikalen Grundausstattung eines jeden Säugetier-Gehirns und lassen sich daher "am einfachsten" miteinander vergleichen.

### **1.5 Struktur und Funktion des Neokortex - die Grundlagen**

Seit geraumer Zeit haben sich Hirnforscher der detaillierten Untersuchung der Großhirnrinde gewidmet. Mit der Einführung spezifischer Färbemethoden gegen Ende des 19. Jahrhunderts war jedoch der Übergang von der reinen Beschreibung der Oberflächenmorphologie zur Feinanalyse auf histologischer Ebene geschaffen: Die neuen Methoden von Neuroanatomen wie Camillo Golgi (Golgi-Versilberung, um 1870) und Franz Nissl (Nissl-, Kresylviolett-färbung, um 1890) gelten hierbei als Paradebeispiele (Striedter 2005). Auf der Basis dieser Färbungen wurden noch heute gültige Standardwerke zur Zyto- und Myeloarchitektonik der menschlichen Großhirnrinde geschaffen: so durch Paul Flechsig (1898), Alfred Campbell (1905),



Korbinian Brodmann (1909), Santiago Ramón y Cajal (1910), Oskar Vogt (1910), Constantin von Economo und Georg Koskinas (1925) sowie Edith Gerhardt (1940), um einige herausragende Autoren zu nennen (Welker 1990). Die folgende Abbildung zeigt Lateralansichten der Endhirn-Hemisphäre aus den vier wichtigsten Werken zur Rindenarchitektonik des Menschen:

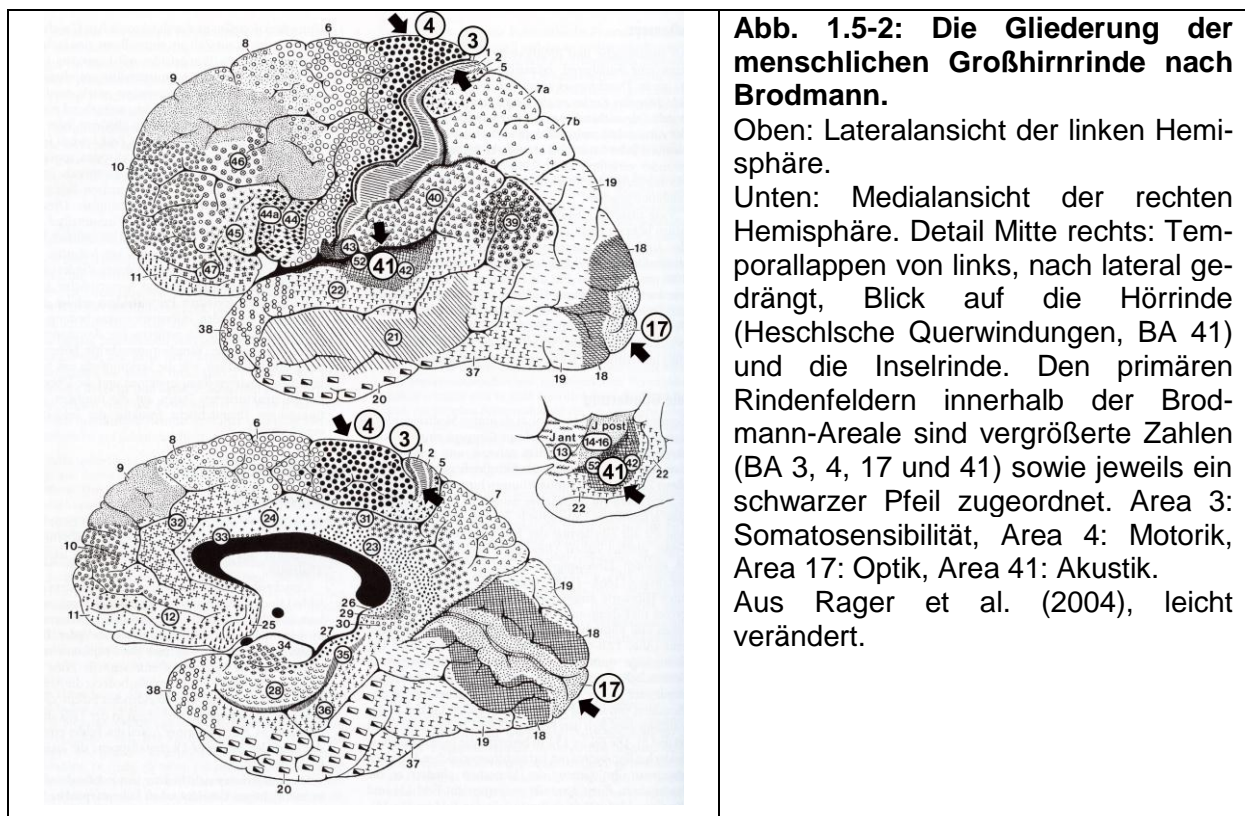


**Abb. 1.5-1: Exemplarische Lateralansichten zur Rindenarchitektonik des Menschen.** Dargestellt sind die Kartierungen von Flechsig (A), Brodmann (B), von Economo und Koskinas (C) sowie von Gerhardt (D). Beachte die Unterschiede sowohl in der Oberflächenmorphologie als auch in der Ausdehnung der Areale bei den unterschiedlichen Autoren. Aus Welker (1990); leicht modifiziert.

Der zeitlose Charakter dieser Werke für die aktuelle Hirnforschung ist unumstritten; dies erhellt auch daraus, dass die von dem Neurologen und Psychiater Korbinian Brodmann (1868-1918) erstmals identifizierten und benannten Hirnrindenfelder (Brodmann-Areale, BA; Brodmann 1906, 1909) zu seiner Zeit allgemein akzeptiert, später nur teilweise modifiziert wurden und heute am meisten verwendet werden. Bei allen Schwierigkeiten im Detail (Variabilität in der Topographie und Ausdehnung der BA) hat sich immer wieder gezeigt, dass physiologisch bzw. klinisch-pathologisch-neurologisch charakterisierte Rindenbezirke recht gut mit den anatomisch-histologischen Brodmann-Arealen korrespondieren. Die einfachsten Brodmann-Areale sind, gewissermaßen als Prototypen, die sog. "primären Rindenfelder", welche die Endstellen der drei hauptsächlichen Sinnessysteme (Somatosensibilität,

S1; Akustik, A1; visuelles System, V1) bzw. den Ausgangspunkt für die Somatomotorik (M1) repräsentieren. In der heutigen Nomenklatur, welche weitgehend auf Brodmann zurückgeht, stehen Area 3 (genau: 3b) für die primär-somatosensible, Area 4 für die primär-motorische, Area 17 (striata) für die primär-visuelle sowie Area 41 für die primär-auditorische Rinde.

Die folgende Abbildung gibt die Topographie der vier primären Rindenfelder im Detail wieder:



Die Grundlage für die Arealisierung der einzelnen Rindenfelder lieferten histologische Arbeiten, in welchen anhand von wenigen  $\mu\text{m}$  (Mikrometer) dicken Gewebeschnitten (meist Kresylviolett- gefärbt oder versilbert) die Architektonik des Kortex analysiert wurde. Auffallend war dabei eine von der kortikalen (pialen) Oberfläche bis hin zum Album (Markraum) mehr oder minder deutliche, abwechselnde Schichtung von Perikarya und Marklamellen. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich jedoch auch, dass der Neokortex einen Grundbauplan besitzt, welcher (trotz regionaler Abweichungen und im Gegensatz zur Situation im Palaeokortex und Archikortex) stets auf einen "sechsschichtigen tektogenetischen Grundtypus" (Brodmann 1909) zurückgeführt werden kann. Dabei variieren die einzelnen Rindenfelder

unterschiedlich stark in der Realisierung dieses Grundbauplans, v.a. was die Dicke und Binnen-Struktur der einzelnen Schichten, die Morphologie der Neuronenpopulationen (Perikarya) sowie den Verlauf der Fasersysteme anbelangt. Infolgedessen haben sich im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Hirnforschern mit der Frage nach einer adäquaten Terminologie der Rindenschichtung beschäftigt. Tabelle 1.5-1 liefert einen kurzen Überblick zur Entwicklung der Terminologie für die primär-visuelle Rinde (Area striata, BA 17).

**Tab. 1.5-1** Beispiele zur Schichtengliederung der Area striata durch verschiedene Autoren

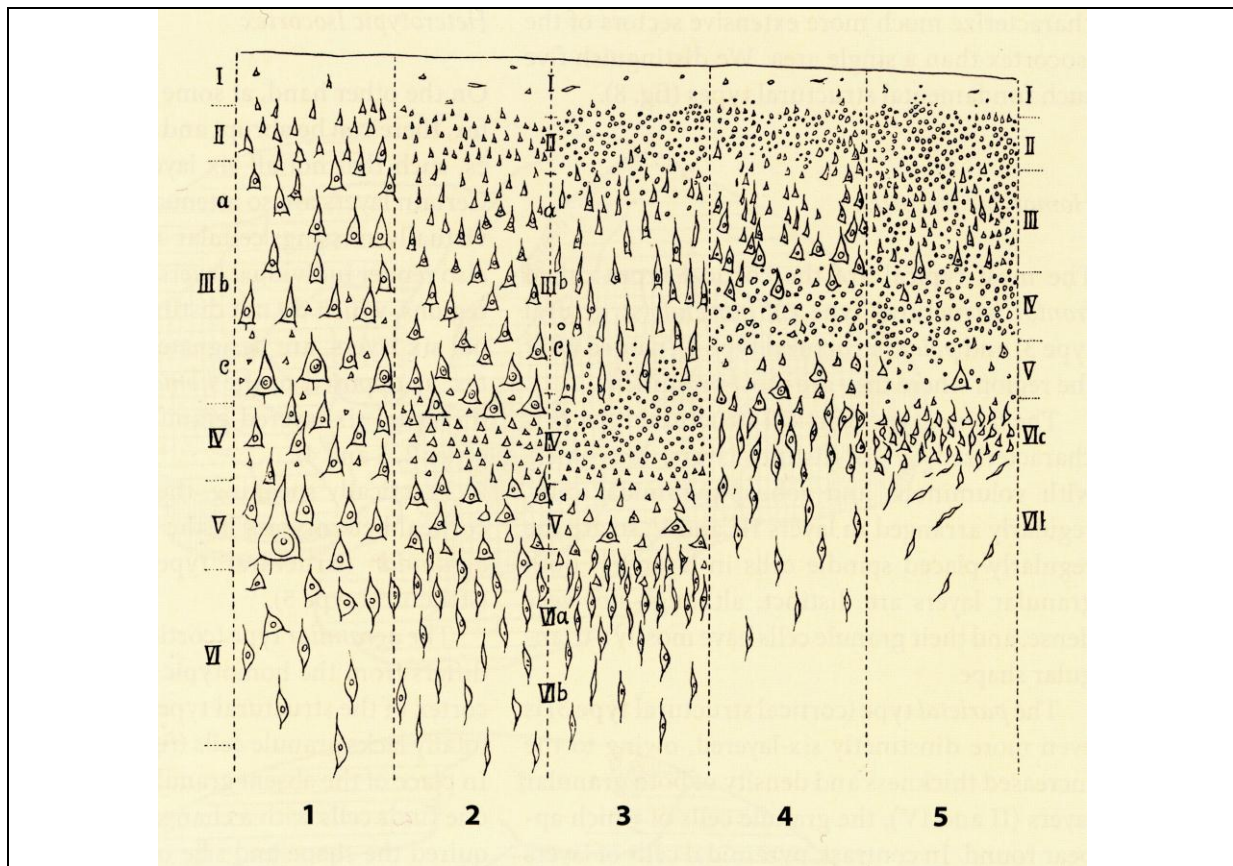
Ramón y Cajal (1909-1911)	Brodmann (1909)	v. Economo und Koskinas (1925)	Rose (1935)	Bailey und von Bonin (1951)	Garey (1971)	Lund und Boothe (1975)	Braak (1976)
1	I	I	I	i	I	I	I
2	II	II	II	ii	II	II	II
	III	III	III	iiia	IIIa	IIIA IIIB	IIIa,b
3	IVa	(IIIb)	IVa	iiib	IIIb	IVA	IIIc-IVa
4	IVb	(IIIc)	IVb $\alpha$	iva	IIIc	IVB	IVb
			IVb $\beta$			IVC $\alpha$	IVc $\alpha$
5	IVc	IV	IVc	ivb $\alpha$	IV	IVC $\beta$	IVc $\beta$
6		Va	Va		ivb $\beta$	V	VA
7	V	Vb	Vb	v			VB
8	VIa	VI	VI	via	VI	VI	VIa
9	VIb		VII	vib			VIb

Der grau angedeutete Horizont gibt ungefähr die Lage des Gennari-Streifens wieder. Wegen dieses makroskopisch sichtbaren Streifens, in dem ein Hauptteil der eingehenden Thalamusfasern verläuft, wird Area 17 auch Area striata (gestreiftes Areal) genannt.

Modifiziert nach Braak (1984).

Wie die Tabelle zeigt, hat sich für die primär-visuelle Area 17, wie für die anderen Neokortex-Areale auch, in der Literatur eine sechsschichtige Grundgliederung mit unterschiedlich gewichteten Sublayers etabliert. Die jeweiligen Abweichungen bei den einzelnen Autoren beruhen auf unterschiedlich definierten Schichtgrenzen. Als wichtiges Schichtkriterium gilt dabei allgemein der zelluläre Aufbau (Perikaryen): entweder überwiegen große Pyramidenzellen, oder kleinere Körnerzellen (granuläre Zellen) dominieren das Bild. So ergibt sich entlang des Kortex ein Kontinuum aus eher pyramidal (d.h. nicht-granulär bzw. agranulär) oder eher granulär (reich an Körnerzellen) geprägten Arealen mit einer Vielzahl von Zwischen- bzw. Übergangsformen.

Abbildung 1.5-3 zeigt hierzu eine durch von Economo (1925) eingeführte Einteilung des Neokortex in 5 Grundtypen sechsschichtiger Rindenareale.



**Abb. 1.5-3: Die fünf Grundtypen des Neokortex.**

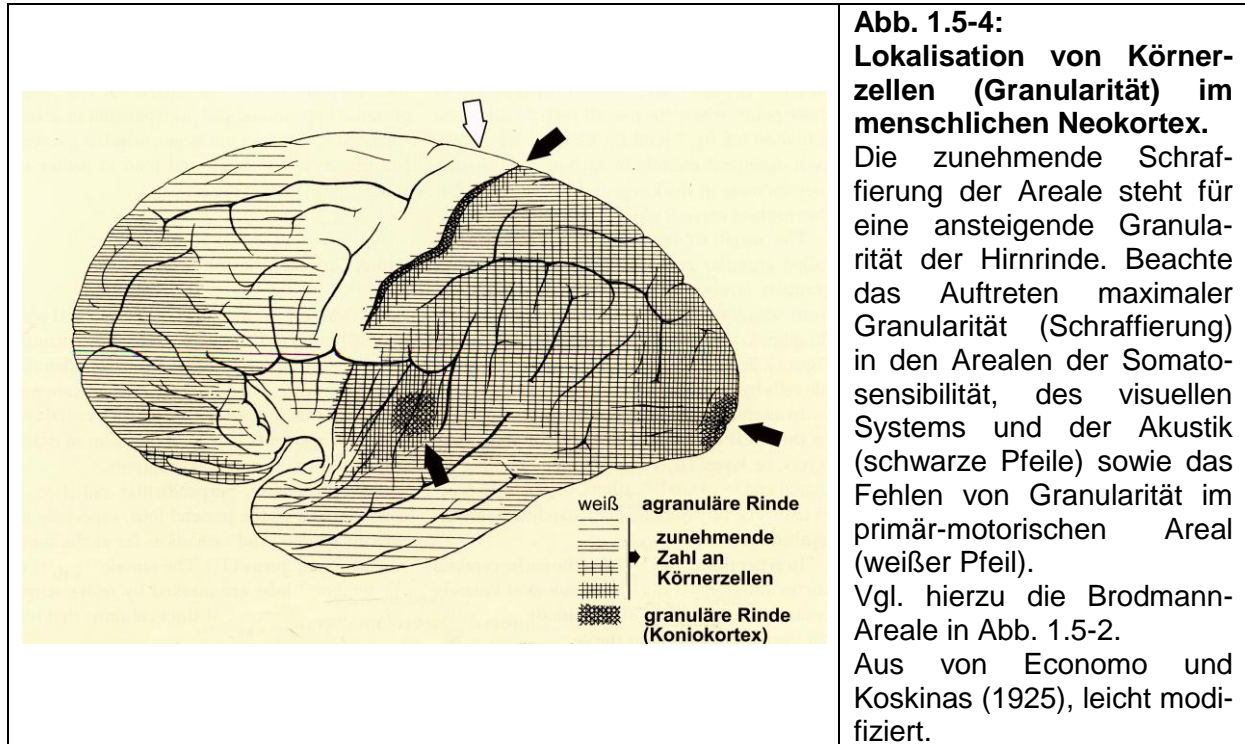
Von Economo hat für die Klassifizierung dieser Typen von einzelnen Rindenarealen lediglich zwei Parameter verwendet, und zwar die beiden diametral unterschiedlichen Zelltypen: a) die weitläufig angetroffenen Pyramidenzellen (eher dreieckig und groß) sowie b) die schier zahllos und dicht gepackt auftretenden Körnerzellen (eher rundlich und klein). Daraus ergibt sich ein mehr oder minder gleichförmiges theoretisches Kontinuum vom rein agranulären (pyramidalen) Kortex, der fast nur aus Pyramidenzellen besteht und relativ dick erscheint (1) über Zwischenformen (2-4) bis hin zum granulären (koniokortikalen) Kortex, der fast nur aus kleinen und kleinsten Körnerzellen besteht und relativ dünn angelegt ist (5). Die Originalterminologie zu 1-5 stammt aus von Economo (1925). 1: agranulär, 2: frontal, 3: parietal, 4: polar, 5: granulär (koniokortikal). Die römischen Ziffern geben die jeweiligen Rindenschichten wieder.

Aus von Economo (1925).

Die primäre Unterscheidung der Rindenareale erfolgt also anhand der Zusammensetzung des Zellbildes, d.h. ob die größeren Pyramidenzellen dominieren oder die kleinen Körnerzellen. Einer Region mit einer Vielzahl kleiner Körnerzellen, insbesondere in den Rindenschichten II und IV (vgl. Abb. 1.5-3: Grundtypus 3), also mit vorhandener Granularität, wird daher der Begriff "*Koniokortex*" (von griechisch "konios": Sandkorn) zugeschrieben (Kahle 1975).



Betrachtet man nun die Großhirnrinde des Menschen hinsichtlich der Lage und Ausprägung von Regionen mit besonders deutlich angelegter Granularität, ergibt sich folgendes Bild:



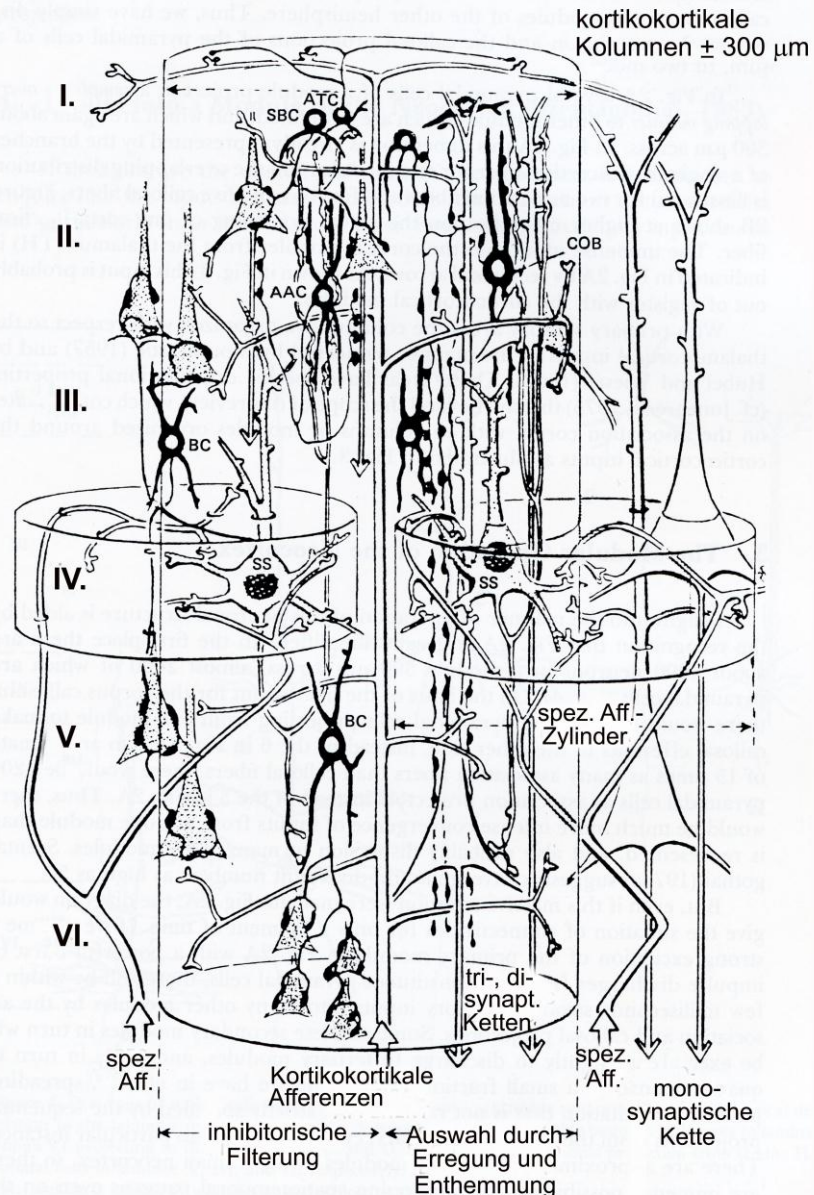
Eine maximal ausgeprägte Granularität scheint exklusiv in den drei primär-afferenten (primär-sensorischen) Arealen S1, V1 und A1 vorzuliegen (vgl. Abb. 1.5-4). Das primär-efferente (primär-effektorische) Areal M1 zeigt dagegen eine rein agranuläre Rindenbauweise.

Aus funktioneller Sicht bedeutet dies, dass maximale Granularität (Koniokortikalität) und Signal-Rezeption in engstem Zusammenhang stehen, ebenso Agranularität und Signal-Emission. Die Abnahme von maximaler hin zu weniger deutlich ausgeprägter Granularität in nachgeschalteten Arealen kann also tendenziell auch als morphologisches Zeichen für eine zunehmende (multimodale) Integration verschiedenen Inputs gelten.

Dabei ist auch von Interesse, ob der gleichförmige Bau eines Hirnareals zwangsläufig für eine einheitliche intrinsische Arbeitsweise steht [Funktionelle Unterschiede in einzelnen Arealen wären demnach lediglich unterschiedlichen Anbindungen (afferent und efferent) geschuldet (Creutzfeldt 1977).] oder ob strukturelle Besonderheiten mit ganz speziellen Verschaltungsprinzipien korrelieren.

Neben den morphologischen Arbeiten haben in neuerer Zeit immer weiter verfeinerte neurophysiologische Techniken wertvolle Beiträge zum Verständnis der Hirnrinde gebracht. Auf diese Weise gelang es zunehmend, einzelne kortikale Zellverbände unter Lebendbedingungen zu untersuchen. Die Arbeiten von Mountcastle (1957) am somatosensorischen Kortex sowie jene von Hubel und Wiesel (1962) am visuellen Kortex (jeweils der Katze) waren hierbei Meilensteine. Auf dieser Grundlage konnten innovative Ansätze zur kortikalen Konnektivität formuliert werden, die besagen, dass lokal getrennte Neuronenpopulationen im Kortex durch die stimulus-spezifische temporäre Synchronisierung ihrer oszillatorischen Aktivität als funktionelle Einheiten agieren können (Gray und Singer 1989). All diese Erkenntnisse sind von erheblicher nachhaltiger Bedeutung für das Verständnis allgemeiner und höherer Kortex-Funktionen, beispielsweise in multisensorisch- multimodalen Prozessen.

In einer eher morphologisch-kybernetisch orientierten Richtung neurobiologischer Forschung gelang durch die Synthese von strukturellen und funktionellen Erkenntnissen eine weitere wichtige Entdeckung, nämlich die der modulären Organisation des Kortex (Szentágothai 1975, 1978, 1979; Eccles 1984, 1989; Galuske 1994; Nieuwenhuys 1994, 1998). Nach diesem theoretischen Konzept befinden sich alle Neuronen, die jeweils derselben physiologischen Aufgabe dienen, in einem vertikalen, durch alle sechs kortikalen Schichten hindurchziehenden Modul (auch Säule oder Kolumne genannt). Innerhalb eines solchen Moduls vollziehen die unterschiedlichsten Zelltypen spezifische Aktionen, die dann für den Zellverband insgesamt entweder zu einer Hemmung (Inhibition) oder einer Aktivierung (Exzitation) führen. Abbildung 1.5-5 illustriert dieses bis heute gültige Konzept der modulären Funktionsweise des Kortex, welches von János Szentágothai (1979) entwickelt wurde.



**Abb. 1.5-5: Schema zur Modularität des Kortex.**

Neuronale Verknüpfung innerhalb einer kortikokortikalen Kolumne bzw. eines Moduls (virtueller zylindrischer Raum) mit einem Durchmesser von  $\pm 300 \mu\text{m}$ .

Im Modul laufen auf Höhe der Schicht IV spezifische Afferenzen (spez. Aff., s.u.) innerhalb zweier unterschiedlicher Räume (Scheiben) ein. Der Eingang kortikokortikaler Afferenzen (unten) erfolgt über die gesamte Höhe des Moduls mit unterschiedlicher Gewichtung der einzelnen Schichten, wobei die Reichweite der eingehenden Fasern in Schicht I weit über das eigentliche Modul hinausgeht.

Für den Ausgang von Information sind die auf der rechten Seite dargestellten Pyramidenzellen zuständig, die direkt exzitatorisch über bedornte Sternzellen (spiny stellates, SS) oder per Enthemmung bzw. Disinhibition durch Doppelbuschzellen (cellule à double bouquet, COB) aktiviert werden. Die Doppelbuschzellen blockieren dabei ihrerseits verschiedene andere hemmende Interneuronen (jeweils schwarz ausgefüllt), wie z.B. Korbzellen (basket cells, BC), kleine Korbzellen (small basket cells, SBC), Buschzellen (axonal tuft cells, ATC) oder axo-axonische Zellen (axo-axonic cells, AAC).

Auf der linken Seite ist die hemmende (Filter-)funktion von Interneuronen an kleinen und mittleren Pyramidenzellen dargestellt (letztere deshalb punktiert).

I-VI: Rindenschichten I-VI. Modifiziert nach Szentágothai (1979).

Aktuelle Arbeiten zur Funktionsweise im Inneren des Kortex, mit zumeist methodologisch begründeter Betonung einzelner oder weniger Neuronen (z.B. Einzelzelleableitungen oder Calcium imaging), nutzen neben den bereits erwähnten Methoden auf der Ebene des Zellverbandes neuerdings zusätzlich molekulare Verfahren auf der Ebene von Proteinen und Genen (Proteinelektrophorese, in-situ-Hybridisierung, PCR, Optogenetik etc.; Ascoli et al. 2008; Scanziani und Häusser 2009). Dabei gilt eine Synthese aus morphologisch-histologischen (z.B. tract tracing oder Immunhistochemie) und neurophysiologisch-bildgebenden Ansätzen (z.B. EEG, MEG oder fMRT) gerade für die Bearbeitung komplexer Fragestellungen (nach dem Wirkmuster ganzer Neuronenverbände und -netzwerke, z.B. kortikaler Interneuronen) weiterhin als Goldstandard, je nachdem welche Fragestellung es auf mikro-, meso- oder makroskopischer Ebene im Einzelnen zu bearbeiten gilt (Jones 2009).

Der synoptische Charakter des Schemas in Abbildung 1.5-5 macht deutlich, wie komplex und vielfältig mögliche zelluläre Interaktionen innerhalb des Kortex ablaufen können und welche hohen Ansprüche dies an die Möglichkeiten des Untersuchers stellt.

Eine auf die Erforschung allgemeiner Funktionsprinzipien der Großhirnrinde ausgerichtete Analyse sollte deshalb auf eine möglichst große Bandbreite unterschiedlicher Herangehensweisen zurückgreifen können und deren Ergebnisse miteinander abgleichen; und dies sowohl in methodischer Hinsicht als auch theorembezogen, also im Hinblick auf Korrelationen zwischen Morphologie, Topographie und Funktion. In der vorliegenden Arbeit soll der vergleichende Ansatz auf jeweils drei unterschiedlichen Abstraktionsniveaus angewendet werden:

- 1) Methodik: Vielversprechend ist eine Kombination extrem erfolgreicher Routineverfahren (Nissl/Kresylviolett-färbung, Golgi-Versilberung) einerseits mit modernsten Techniken wie der Immunhistochemie und der computergestützten, design-basierten Stereologie andererseits (Kern et al. 2011).

- 2) Probenauswahl: Die Auswahl der untersuchten Säugetier-Spezies erzeugt ein intellektuelles Spannungsfeld, da bei all diesen Tieren derselbe Kortex-Bauplan unterschiedlichen Anforderungen gerecht werden muss, je nach der Beschaffenheit des betreffenden Lebensraums bzw. der ökologischen Nische. Mensch und Delphin nehmen dabei als zerebrale Extremformen eine zentrale Stellung ein, hier geht es vor allem um die Analyse konvergent entstandener Charakteristika (Hirngröße, Neokortex-Anteil etc.). Die übrigen Spezies (Schwein, Schaf und Hund) bilden als



Korrektive gewissermaßen den phylogenetischen Rahmen für die Beurteilung der gewonnenen Ergebnisse (siehe Abschnitt 1.3). Der Mensch kann dabei formal als eine Art von bestbekanntem Standard gelten, der Delphin als bisher nur sporadisch untersuchtes, zugleich wenig verstandenes und deshalb besonders reizvolles Gegenstück dazu.

3) Vorgehensweise: Die vier primären Rindenareale (A1, M1, S1, V1) sind innerhalb des Neokortex maximal charakteristisch und vergleichsweise gut bekannt. Ihre konsequente vergleichende Untersuchung erfolgt sowohl im intraspezifischen Ansatz (also alle Areale einer Art jeweils nebeneinander) als auch im interspezifischen Zusammenhang (jeweils ein Areal bei sämtlichen untersuchten Säugetieren). Exemplarisch ist schließlich der Vergleich von zwei Zahnwal- Spezies mit den Methoden der design-basierten Stereologie, welcher auf einen zentralen Ausschnitt [Schichten III-V] der genannten Rindenareale fokussiert. Dieses mehrstufige Procedere ermöglicht eine vielgliedrige synthetische Betrachtung, bei der Abweichungen vom gemeinsamen Bauplan des Neokortex funktionell bzw. evolutionsbiologisch erklärt werden sollen. Auf diese Weise wird es möglich, unser prinzipielles Verständnis der Hirnrinde und ihrer strukturellen und funktionellen Leitmotive zu vertiefen. Nicht zuletzt sollen mit dieser Untersuchung auch die Voraussetzungen für die systematische Erforschung hierarchisch übergeordneter bzw. assoziativer Rindenbereiche geschaffen werden. Auf diesem Wege könnte es eines Tages vielleicht möglich werden, von Eccles und anderen Forschern beschriebenen einzigartigen Phänomenen wie Bewusstsein, Denken und Erinnerung auf neuronaler Ebene fassbare Korrelate gegenüberzustellen.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Zur Systematik der untersuchten Säugetiere

Die in der vorliegenden Dissertation bearbeiteten Exemplare bzw. Spezies entstammen verschiedenen Säugetierordnungen (siehe Kap. 1.3). Neben einigen ausgewählten Zahnwalen (u.a. La-Plata-Delphin, Schweinswal und Großer Tümmler) werden auch zwei Paarhufer (Schwein und Schaf), ein Fleischfresser (Hund) sowie zwei Primaten (Gorilla und Mensch) hinsichtlich der Struktur und Funktion ihrer Großhirnrinde genauer analysiert.

### 2.2 Charakteristika der untersuchten Spezies

Für einen Teil der Untersuchungen wurden bereits vorhandene histologische Schnittserien von fünf ausgewählten, teilweise extrem seltenen Delphinarten bearbeitet. Dabei handelt es sich um Leihgaben des Naturmuseums und Forschungsinstituts Senckenberg Frankfurt a.M. und um Material der Dr. Senckenbergischen Anatomie in Frankfurt a.M. Tabelle 2.2-1 zeigt eine Übersicht des untersuchten Materials. Die Taxonomie erfolgt auf der Basis von Rice (1998).

**Tab. 2.2-1** Übersicht der bearbeiteten Nissl-Schnittserien aus Museumsleihgaben

<u>Untersuchte Spezies</u>	<u>Trivialname</u>	<u>Sammlung</u>	<u>Sammlungscode</u>
<i>Delphinus delphis</i> (Linnaeus)	Gemeiner Delphin	SMF	T374, T375
<i>Inia geoffrensis</i> (de Blainville)	Amazonas-Delphin	SMF	T419, T420
<i>Neophocaena phocaenoides</i> (Cuvier)	Glattschweinswal	SMF	T479
<i>Pontoporia blainvillei</i> (Gervais & D'Orbigny)	La-Plata-Delphin	SAI	Spec 2969
<i>Tursiops truncatus</i> (Montagu)	Großer Tümmler	SMF	T303, T441
SMF: Naturmuseum und Forschungsinstitut Senckenberg (Frankfurt am Main), SAI: Dr. Senckenbergische Anatomie (Frankfurt am Main)			

In Analogie zur "aufsteigenden Primatenreihe" nach Stephan (1981) wurde bei den Zahnwalen ebenfalls eine Reihung der Spezies (Exemplare) nach der Cerebralisation

(Enzephalisation) im Sinne einer “aufsteigenden Zahnwal-Reihe“ vorgenommen (s.u.).

Tabelle 2.2-2 gibt einen Überblick zu den Körper- und Hirnmassen der hier in Hirnschnittserien untersuchten Zahnwal-Exemplare.

**Tab. 2.2-2** Aufsteigende Reihung der untersuchten Delphine (Nissl-Schnittserien; Museumsleihgaben) nach ihrer Hirnmasse

<u>Delphin-Spezies</u>	<u>Körpermasse (kg)</u>	<u>Hirnmasse (g)</u>
La-Plata-Delphin <sup>1)</sup>	34,9	220
Glattschweinswal <sup>2)</sup>	32,4	468
Amazonas-Delphin <sup>2)</sup>	62,4	610
Gemeiner Delphin <sup>2)</sup>	52,0	765
Großer Tümmler <sup>2)</sup>	144,0	1560
Quelle der Daten: Schwerdtfeger et al. (1984). 1) SAI: Dr. Senckenbergische Anatomie; 2) SMF: Sammlung G. Pilleri im Naturmuseum und Forschungsinstitut Senckenberg Frankfurt a.M.		

Die übrigen Untersuchungen an Schwein, Schaf, Hund, Gorilla, Mensch sowie zwei weiteren Delphinen (Schweinswal und Großer Tümmler) basieren auf frisch gewonnenen und eigens für die vorliegende Arbeit prozessierten Hirnproben. Tabelle 2.2-3 liefert eine Übersicht zu diesem Hirnmaterial samt einigen zusätzlichen Daten, soweit diese erhoben werden konnten.

**Tab. 2.2-3** Übersicht der für die vorliegende Dissertation bearbeiteten Hirnproben

<u>Untersuchte Spezies</u>	<u>Trivialname</u>	<u>Code</u>	<u>Details</u>
<i>Phocoena phocoena</i> <sup>1)</sup>	Schweinswal	PP4417	adultes Exemplar; Sex: unbekannt; KL: 138 cm; KM: 41,7 kg; HM: unbekannt
<i>Tursiops truncatus</i> <sup>2)</sup>	Großer Tümmler	TT133	adultes Exemplar; Sex: unbekannt; KL: ca. 250 cm *; KM: ca. 200 kg *; HM: unbekannt
<i>Sus scrofa</i> <sup>3)</sup>	Schwein	SS1	Sex: männlich; Alter: 6 Monate; Landschweinrasse KM: 57,0 kg; HM: 100,7 g
<i>Ovis aries</i> <sup>4)</sup>	Schaf	OA1	adultes Exemplar; HM und KM: jeweils unbekannt

<i>Canis familiaris</i> <sup>5)</sup>	Hund	CF1	Sex: männlich; adultes Exemplar; Mischling (Retriever/ Schäferhund); KM und HM: jeweils unbekannt
<i>Gorilla gorilla</i> <sup>6)</sup>	Gorilla	GG1	Geschlecht: weiblich; Alter: 55 Jahre; KM: 96,7 kg; HM: 487,6 g
<i>Homo sapiens</i> <sup>7)</sup>	Mensch	G99-121	Geschlecht: männlich; Alter: 82 Jahre; KM und HM: jeweils unbekannt; PMI: 7 Stunden
Herkunft des Materials: 1) Dr. U. Siebert, Forschungs- und Technologiezentrum Westküste, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Tier als Beifang in der Nordsee verendet; keine neuropathologischen Auffälligkeiten. 2) Prof. B. Cozzi, Department of Experimental Veterinary Science, University of Padova, Italien. Tier unter tierärztlicher Kontrolle verendet, keine neuropathologischen Auffälligkeiten. 3) Dr. A. Theisen, Zentrale Forschungseinrichtung (ZFE) des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, keine neuropathologischen Auffälligkeiten. 4) Marokkanische Metzgerei in Frankfurt a.M. 5) Department of Anesthesiology, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA. 6) Dallas Zoo, Dallas, USA; keine neuropathologischen Auffälligkeiten. 7) Prof. Patrick Hof, Department of Neuroscience, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA; keine neuropathologischen Auffälligkeiten. Abkürzungen. HM: Hirnmasse, KM: Körpermasse, KL: Körperlänge, PMI: post-mortem-Intervall (Zeit nach dem Tod bis zur Entnahme der Hirnproben), *: Schätzwert.			

Die stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Neuronendichte (s. Kap. 2.4.2) werden an Neokortices zweier Zahnwale unterschiedlicher Familien durchgeführt: einem Schweinswal (PP4417, s. Tab. 2.2-3) sowie einem Großen Tümmler (TT133, s. Tab. 2.2-3). Dabei werden jeweils die vier primären Rindenareale M1, S1, A1 und V1 analysiert.

Tab. 2.2-4 liefert für diese beiden Zahnwal- Arten Hintergrundinformationen, die für die ökophysiologische Einordnung der beiden Spezies von Bedeutung sind (s. Kap. 4.2; vgl. Kern et al. 2011).

**Tab. 2.2-4** Physikalische und physiologische Hintergrundinformationen zum Schweinswal (PP 4417) und zum Großen Tümmler (TT133)

<u>Parameter</u>	<u>Schweinswal</u>	<u>Großer Tümmler</u>
Durchschnittliche Körperlänge [cm]	130-180 <sup>a)</sup>	227-340 <sup>b)</sup>
Körperlänge der untersuchten Exemplare [cm]	138	250 *
Durchschnittliche Körpermasse [kg]	27-41	140-278 <sup>b)</sup>
Körpermasse der untersuchten Exemplare [kg]	41,7	200 *
Durchschnittliche Gehirnmasse [g]	509,75	1824 <sup>c)</sup>
Encephalisationsindex <sup>d)</sup>	9,44	15,80
Lebensraum <sup>e)</sup>	Küstennähe	Hochsee
Normale Gruppengröße (Anzahl Individuen) **	1-3	2-15

Akustische Signale	Klicks <sup>f)</sup>	Klicks, Piffe <sup>f)</sup>
Bandbreite der Klicks (Echolokation)	Schmal <sup>f)</sup>	Breit <sup>f),g)</sup>
Frequenzbereich der Klicks [kHz]	119-128 <sup>h)</sup>	35-132 <sup>h)</sup>
Spitzenfrequenzen [kHz]	124 <sup>h)</sup>	67-114 <sup>h)</sup>
Maximaler Schalldruck pro Klick [dB re 1 µPa]	191 <sup>h)</sup>	218-228 <sup>i)</sup>
Frequenz des besten Hörens [kHz]	130 <sup>f)</sup>	60-80 <sup>f), k)</sup>
Obere Hörgrenze [kHz]	150 <sup>f)</sup>	150 <sup>f)</sup>
Maximale Sensitivität [dB re 1 µPa]	47 <sup>f)</sup>	42 <sup>f)</sup>
Quelle der Daten: a) Kinze (1994); b) Ridgway (1990); c) Hof et al. (2005); d) Schwerdtfeger et al. (1984); e) Rice (1998); f) Au und Hastings (2008); g) Huggenberger et al. (2009); h) Morisaka und Connor (2007); i) Ketten (1998); k) Supin et al. (2001). *: Schätzwert. **: Bjorge und Tolley (2009) sowie Wells und Scott (2009).		

## 2.3 Die Bearbeitung der Kortexproben

Im Folgenden wird erläutert, auf welche Weise die verschiedenen Neokortex-Proben von der Entnahme bis zur histologischen Aufarbeitung behandelt wurden.

### 2.3.1 Probenentnahme

Bei allen untersuchten Spezies wurden folgende Neokortex-Areale zunächst mit der Digitalkamera dokumentiert und anschließend entnommen:

- primär motorische Rinde (M1)
- primär somatosensible Rinde (S1)
- primär auditorische Rinde (A1)
- primär visuelle Rinde (V1)

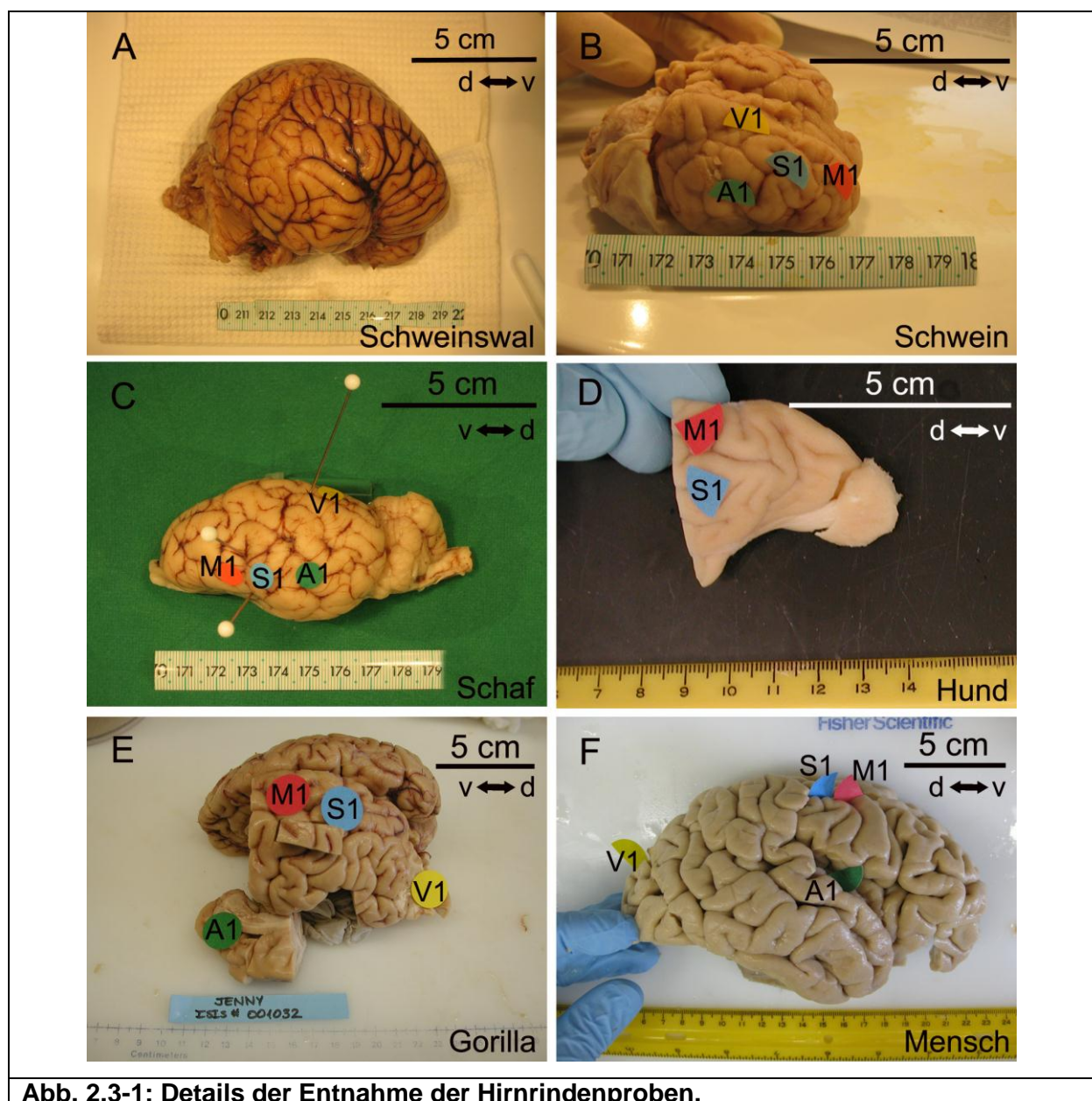
Um diese Areale bei allen bearbeiteten Säugetieren verlässlich auffinden und eindeutig identifizieren zu können, wurde zur topographischen Absicherung der Probenentnahme die relevante Fachliteratur herangezogen. Unter anderem handelt es sich dabei um folgende Literatur- Quellen (exemplarisch sind die jeweils vier wichtigsten angegeben):

**Tab. 2.3-1** Quellennachweis zur Lokalisierung der beprobten Rindenareale.

<u>Spezies</u>	<u>Quellen zur Rindentopographie</u>
Schweinswal	Lende und Welker (1972), Kesarev et al. (1977), Ladygina et al. (1978), Morgane et al. (1986)

Großer Tümmler	Lende und Welker (1972), Kesarev et al.(1977), Ladygina et al. (1978), Morgane et al. (1986)
Schwein	Adrian (1943), Woolsey und Fairman (1946), Andrews et al. (1990), Jarvinen et al. (1998)
Schaf	Simpson und King (1911), Adrian (1943), Woolsey und Fairman (1946), Johnson et al. (1974)
Hund	Tunturi (1944), Bromiley et al. (1956), Popova (1968), Gorska (1974), Nickel et al. (1984)
Gorilla	Mauss (1911), Campbell (1916), Leyton und Sherrington (1917), Fulton (1938)
Mensch	Brodmann (1909), von Economo und Koskinas (1925), Leonhardt und Lange (1987), Nieuwenhuys (1998)

Weitere Details der Probenentnahme zeigt Abbildung 2.3-1 anhand einiger Beispiele.



**Abb. 2.3-1: Details der Entnahme der Hirnrindenproben.**

Dargestellt sind Lateralansichten der Gehirne vom Schweinswal (A), Schwein (B), Schaf (C), Hund (D), Gorilla (E) sowie dem Menschen (F). Die primären Areale für Motorik (M1, rot), Somatosensibilität (S1, blau), Akustik (A1, grün) und Optik (V1, gelb) sind auf den jeweiligen Gyri durch Farbmarkierungen hervorgehoben. Beachte, dass die Gehirne von Gorilla und Mensch aufgrund neuropathologischer Untersuchungen vor der eigenen Beprobung teilweise fragmentiert wurden. Das Gehirn des Hundes wurde hälftig zerteilt, wobei hier der rostrale Anteil mit dem Bulbus olfactorius zu sehen ist. Jedes Foto enthält zum besseren Größenvergleich oben rechts einen Maßstab (5 cm). Darunter befindet sich jeweils ein Hinweis [Doppelpfeil mit "d" = dorsal (occipital) und "v" = ventral (rostral)] zur Orientierung am Präparat.

### **2.3.2 Fixation des Gewebes**

Sämtliche untersuchten Gehirne wurden nach ihrer Entnahme in einer Lösung aus 4,0% Paraformaldehyd-Phosphatpuffer (4,0% PFA-PB) bei 4 °C für mehrere Wochen bis Monate immersionsfixiert. Nach erfolgter Beprobung dieser Gehirne wurden die gewonnenen Gewebelöckchen in einer Lösung aus Phosphatpuffer-Saline mit 0,1% Natriumazid (PBS-Azid) bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.3.3 Kryoprotektion und Schneiden**

Um das Gewebe bei der anschließenden Kryotomie vor Gefrierschäden zu schützen, wurden die Gewebeproben in einer Reihe von Sucrose-Lösungen (ansteigender Konzentration) in Phosphatpuffer bei 4 °C aufbewahrt (PB-Sucrose; Kryoprotektion). Um diese Lösungen für die Lagerung über mehrere Wochen hinweg haltbar zu machen, wurden sie, wie schon die Aufbewahrungsflüssigkeit, jeweils mit 0,1% Natriumazid versetzt.

Als Zeichen der erfolgreichen Durchtränkung in jeder Konzentration von PB- Sucrose wurde das Absinken des Präparats auf den Grund des betreffenden Becherglases gewertet.

Alle Proben durchliefen vor dem Schneiden nacheinander folgende Lösungen:

- PBS-Azid- 10% Sucrose
- PBS-Azid- 20% Sucrose
- PBS-Azid- 30% Sucrose

Anschließend wurden die Proben mit einem konventionellen Mikrotom (Jung Histoslide 2000R, Leica, Nussloch) geschnitten. Dafür wurde zunächst der Objektisch des Mikrotoms mit Hilfe von Trockeneis auf eine Temperatur von ca. - 50 °C tiefgefroren. Das Trockeneis wurde im Eisgraben um den Objektisch herum verteilt und in regelmäßigen Abständen von ca. 20 Minuten ergänzt, da es bei

Raumtemperatur relativ schnell verdampft. Anschließend wurden die aus der PBS-Azid-30% Sucrose-Lösung entnommen Proben auf dem Objektisch mit Tissue-Tek® aufgefroren. Nachdem die Gewebeblöckchen dann unter einer Isolierschicht aus Aluminiumfolie nach einigen Minuten komplett durchgefroren waren - erkennbar an der homogen-milchigen Aufhellung des Gewebes- wurde an der Schnittfläche einer jeden Probe solange zwischen Auftauen (Entfernen der Aluminiumfolie und Tauen des Gewebes durch die umgebende Raumtemperatur) und erneutem Herunterfrieren (Anbringen der Aluminiumfolie zur Isolierung) austariert und gewechselt, bis an der Schnittfläche eine Arbeitstemperatur von ca. - 20 °C herrschte. Das Erreichen dieser Arbeitstemperatur an der Schnittfläche wurde über ein diskretes Nachdunkeln des Gewebes, den optimalen, kontinuierlichen Schneideprozess und die anschließende Integrität der Schnitte definiert. Auf diese Weise wurden sämtliche Gewebeproben (sofern nicht anders vermerkt) bei einer Dicke von 60 µm koronal geschnitten und die Schnitte danach mit einem Pinsel in Eppendorfgefäße mit PBS-Azid überführt. So aufbewahrt, lagerten die Schnitte bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlraum.

### 2.3.4 Die klassischen Färbemethoden

#### Die Nissl-Färbung:

Für diese Färbung wurden die Kortexschnitte zunächst auf mit Chromalaungelatine beschichtete Objektträger aufgezogen, dann über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am nächsten Tag nach dem Vorgehen in Tabelle 2.3-2 gefärbt:

**Tab. 2.3-2** Einzelschritte bei der Nissl-Färbung

<u>Art der Lösung</u>	<u>Dauer der Einwirkung</u>	
70% Ethanol	2	Minuten
95% Ethanol	2	Minuten
100% Ethanol	2	Minuten
100% Ethanol	2	Minuten
Chloroform	5	Minuten
Chloroform	5	Minuten
100% Ethanol	2	Minuten
100% Ethanol	2	Minuten
95% Ethanol	2	Minuten
70% Ethanol	2	Minuten



50% Ethanol	2	Minuten
30% Ethanol	2	Minuten
Aqua bidest	2	Minuten
Kresyl-Violett-Lösung*	5	Minuten
Aqua bidest	kurz Eintauchen	
Aqua bidest	kurz Eintauchen	
30% Ethanol	7	Sekunden
50% Ethanol	7	Sekunden
70% Ethanol	7	Sekunden
95% Ethanol mit 500 µl Eisessig	2-3	Minuten (je nach Differenzierung)
100% Ethanol	5	Sekunden
100% Ethanol	5	Sekunden
D-Limonen	10	Minuten
D-Limonen	10	Minuten
* Die Herstellung der Kresylviolett-Lösung wird im Anhang (Kap. 10) genauer erläutert.		

Abschließend wurden die Schnitte mit DPX<sup>®</sup> eingedeckt und mehrere Tage bei Raumtemperatur zur Trocknung gelagert.

#### Die Rapid Golgi-Imprägnation:

Für diese Methode wurden die entnommenen Kortexpuben nach einem modifizierten Protokoll (modifizierte Golgi-Versilberung; Rosoklija et al. 2003) behandelt:

Zunächst wurden die Gewebeblöckchen auf ca. 1,5 cm<sup>2</sup> (Breite mal Höhe) und eine Dicke von ca. 3 mm grob zurechtgeschnitten. Dann wurden die Proben mit frisch zubereitetem 4,0% Agar (Merck, Darmstadt) ummantelt, der in lauwarmem Zustand mit Hilfe von Transfer-Pipetten über die Oberfläche der Gewebeblöckchen verteilt wurde, danach einige Minuten abgekühlt und anschließend mit Rasierklingen von einer Seite auf eine Dicke von ca. 1 mm getrimmt. In ihrer Agar- Umhüllung kamen die Blöckchen dann in 25 ml einer Lösung aus 3,0% Kaliumdichromat in Aqua bidest und wurden bei 4 °C im Kühlschrank für ca. eine Woche aufbewahrt. Danach wurden die Blöckchen kurz mit Aqua bidest abgespült, in Lösungen aus zunächst 0,7%, dann 0,9% Silbernitrat in Aqua bidest für einige Sekunden gewaschen und anschließend für eine Woche in je 50 ml einer Lösung aus 1,0% Silbernitrat gelagert.

Abschließend wurden die Blöckchen für fünf Minuten in 70% Ethanol gereinigt und mit einem Vibratom (VT 1000 S, Leica, Wetzlar) 100 µm dick geschnitten. Nach dem Aufziehen der Schnitte auf Chromalaungelatine-beschichtete Objektträger wurde das Gewebe über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, dann durch eine aufsteigende

Reihe aus 70%, 96%, 100% Alkohol sowie Xylol entwässert und schließlich mit Shandon Xylene Substitute Mountant™ eingedeckt.

Zur bildlichen Darstellung des Golgi- imprägnierten Gewebes im Ergebnisteil (siehe Kap. 3.4) wurden bei einigen ausgewählten Neuronen neben Fotografien auch "Camera lucida"-Darstellungen verwendet: dabei wird das Bild eines weissen Blattes Papier so in den Strahlengang des Mikroskops eingespiegelt, dass der Betrachter das mikroskopische Bild auf dem Blatt Papier sieht und die Konturen/Strukturen darauf einfach nachziehen kann (vgl. Abb. 3.4-2).

### 2.3.5 Immunhistochemie

In diesem Kapitel wird die immunhistochemische Bearbeitung der Kortexprouben erläutert. Dazu zeigt Tabelle 2.3-3 eine Liste der verwendeten Antikörper.

**Tab. 2.3-3** Überblick der verwendeten Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Wirt</u>	<u>Spezies-Reaktivität</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Antigen-Spezifität</u>
<b><u>Primärantikörper:</u></b>					
Calbindin (monoklonal)	MA	AF, HU, KA, MA, ME, MS, RA	1:5000	Swant, Bellinzona, Schweiz (Kat-Nr.: 300)	Aus Hühnerdarm aufgereinigtes Calbindin D-28k als Immunogen für Hybrid-Myelom-Zellen
Calretinin (monoklonal)	MA	ME, RA	1:5000	Swant, Bellinzona, Schweiz (Kat-Nr.: 6B3)	Humanes, rekombinantes Calretinin-22k als Immunogen für 6B3 Hybrid-Myelom-Zellen
Neurofilament, SMI-32 (monoklonal)	MA	AF, ES, HA, HD, KA, KN, MA, ME, MS, RI, SC, SN, ZI	1:4000	Covance, Berkeley, USA (Kat-Nr.: SMI-32R)	Nonphosphorylierter Epitop des Neurofilament H der meisten Säugetierarten
Parvalbumin (monoklonal)	MA	FI, FR, HD, KA, KN, ME, RA, RI, SN, ZI	1:8000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (Kat-Nr.: P3088)	Aus Frosch-Muskulatur aufgereinigt, Immunogen für PARV-19 Hybrid-Myelom-Zellen
<b><u>Sekundärantikörper:</u></b>					
Ziege-Anti-Maus-IgG (biotinyliert)	ZI	MA	1:200	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark (Kat-Nr.: E0433)	
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (biotinyliert)	ZI	KN	1:200	Vector Laboratories, Burlingame, USA (Kat-Nr.: BA-1000)	
Die Angaben erfolgen laut Hersteller. Abkürzungen: Kat-Nr.: Katalog-Nummer, Spezies-Abkürzungen. AF: Affe, ES: Esel, FI: Fisch, FR: Frosch, HA: Hamster, HD: Hund, HU: Huhn, KA: Katze, KN: Kaninchen, MA: Maus, ME: Mensch, MS: Meerschweinchen, RA: Ratte, RI: Rind, SC: Schaf, SN: Schwein, ZI: Ziege.					

Im Folgenden finden sich einige Hintergrundinformationen zu den hier verwendeten Antikörpern bzw. zu deren Zielproteinen.

#### Die Calcium-bindenden Proteine Calbindin (CB), Calretinin (CR) und Parvalbumin (PV):

Das immunhistochemische Labeling mit Hilfe von Antikörpern gegen diese drei Calcium-bindenden Proteine erfasst insgesamt ca. 95 % aller GABAergen (also inhibitorischen) Zelltypen (in vernachlässigbar wenigen Fällen auch Pyramidenzellen), wodurch wertvolle Einblicke in das hemmende Netzwerk kortikaler Interneuronen möglich werden (Hendry et al. 1989; Andressen et al. 1993; DeFelipe 1993; Condé et al. 1994; Alcantara und Ferrer 1995; DeFelipe 1997; Gonchar und Burkhalter 1997; Glezer et al. 1998; Morrison et al. 1998; Hof et al. 1999; DeFelipe 2002; Markram et al. 2004; Hof und Sherwood 2005; Wonders und Anderson 2006; Gonchar et al. 2007; Hof und Sherwood 2007; Ascoli et al. 2008; Jones 2009; Sherwood et al. 2009). Rein quantitativ gesehen machen bei Säugern alle GABAergen Interneuronen zusammen jedoch nur ca. 15-30 % der Gesamtzahl von Neuronen im Neokortex aus (also Pyramidenzellen *und* Interneuronen zusammen; Nieuwenhuys 1994; Gonchar und Burkhalter 1997; DeFelipe 2002; DeFelipe et al. 2002; Wonders und Anderson 2006; Gonchar et al. 2007; Jones 2009). Dabei sind CB- und CR-exprimierende Neuronen (welche nur äußerst selten beide Antigene gleichzeitig aufweisen) einander in morphologischer Hinsicht relativ ähnlich: meist handelt es sich um bipolare Neuronen (vgl. Abb. 3.4-1 und 3.4-7) oder Doppelbuschzellen (vgl. Abb. 3.4-1 und 3.4-8; Rogers 1992; Alcantara und Ferrer 1995; DeFelipe 1997; Gonchar und Burkhalter 1997; Morrison et al. 1998; Gonchar und Burkhalter 1999; Hof et al. 1999; DeFelipe 2002; Markram et al. 2004; Hof und Sherwood 2005; Wonders und Anderson 2006; Gonchar et al. 2007; Hof und Sherwood 2007; Jones 2009; Sherwood et al. 2009). Dagegen sind PV-positive Zellen meist Kandelaberzellen (vgl. Abb. 3.4-1 und 3.4-9) und multipolare Neuronen (bei Primaten und Nagern bisweilen auch Korbzellen genannt, vgl. Abb. 3.4-1 und 3.4-11; Blümcke et al. 1990; Van Brederode et al. 1990; Hof und Nimchinsky 1992; Condé et al. 1994; Alcantara und Ferrer 1995; Nimchinsky et al. 1997; Glezer et al. 1998; Hof et al. 1999; DeFelipe et al. 2002; Markram et al. 2004; Hof und Sherwood 2005; Wonders und Anderson 2006; Gonchar et al. 2007; Hof und Sherwood 2007; Jones 2009; Sherwood et al. 2009).

### Das Strukturprotein Neurofilament (NF):

Dieses Strukturprotein, welches das neuronale Zytoskelett stützt, besteht aus drei unterschiedlich großen Untereinheiten (zur Angabe der Proteingröße wird die Einheit "Kilo-Dalton" [kDa] verwendet): einer leichten Fraktion (ca. 70 kDa, abgekürzt: NF-L), einer mittleren (ca. 170 kDa, NF-M) und einer schweren Neurofilament-Untereinheit (ca. 200 kDa, NF-H).

Allgemein wird im Kortex das Vorkommen der unphosphorylierten NF-H Untereinheit zur Kartografierung/Parzellierung verschiedener Regionen genutzt, und zwar durch Betrachtung der Lage und Intensität der sog. 'SMI-32-Immunreaktivität' in einzelnen Pyramidenzellen. Der Antikörper SMI-32 richtet sich interessanterweise gegen die unphosphorylierte Form des Carboxy-Terminus der schweren Untereinheiten (NF-H) von Neurofilament im Soma und den Dendriten verschiedener Neuronentypen. Allerdings ist bisher nicht mit letzter Sicherheit geklärt, ob es innerhalb der Säugetiere spezies-spezifische Abwandlungen von Neurofilament gibt und inwieweit diese möglichen Varianten einander homolog sind (Boire et al. 2005). In bisherigen Studien wurde SMI-32 als Detektor für Neurofilament bei diversen Säugetierspezies verwendet: Maus (Van der Gucht et al. 2004, 2007; Goldshmit et al. 2010; Van De Werd et al. 2010), Ratte (Paxinos et al. 1999; Kirkcaldie et al. 2002), Hamster (Boire et al. 2005), Rüsselhündchen (Sherwood et al. 2009), Spitzhörnchen (Wong und Kaas 2009), Ameisenigel (Hassiotis et al. 2004), Katze (Van der Gucht et al. 2001, 2005; Lee und Winer 2008), Hund (Hof et al. 1996a, 1996b), Makake (Hof und Nimchinsky 1992; Hof und Morrison 1995; Hof et al. 1995; Nimchinsky et al. 1996; Lewis und Van Essen 2000), Mensch (Hof et al. 1990; Nimchinsky et al. 1997; Ding et al. 2009; Ding und Van Hoesen 2010) sowie Delphin (Glezer et al. 1992; Hof et al. 1992, 2000; Hof und Sherwood 2005).

### Das immunhistochemische Protokoll:

Die immunhistochemische Bearbeitung der Kortexprouben erfolgte nach der sogenannten 'free-floating method' durch Inkubation in den Vertiefungen von Kulturplatten ('Wells'). Dieses Prinzip bedeutet, dass die Gewebeschnitte unbehindert in einer ausreichenden Menge Flüssigkeit (meist ca. 5 ml pro Well) schwimmen und in der jeweiligen Arbeitslösung für eine bestimmte Zeit auf dem Schüttler dem betreffenden Antikörper ausgesetzt sind.

Die im Folgenden als Waschgänge bezeichneten Schritte bestanden jeweils aus drei aufeinanderfolgenden 10-minütigen Behandlungen, in denen die Gewebeschnitte mit Trisgepufferter Saline gereinigt und mit 0,3% Triton<sup>®</sup> X-100 (TBS-Triton) für die Antikörper aufgeschlossen wurden. Diese Schritte dienten der Entfernung von vormals applizierte Reagenzien und verbliebenen ungekoppelten Antikörpern.

Insgesamt lässt sich das immunhistochemische Labeling des Gewebes in sieben Abschnitte untergliedern:

1. Abreagieren der endogenen Peroxidase
2. Restitution von Antigenstrukturen (antigen retrieval)
3. Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen
4. Inkubation mit dem Primärantikörper
5. Inkubation mit dem Sekundärantikörper
6. ABC-Reaktion
7. DAB-Entwicklung

### **1. Abreagieren der endogenen Peroxidase**

Einem ersten Waschgang folgte zunächst die 10-minütige Behandlung der Gewebeschnitte mit einer Lösung aus 0,3% Wasserstoffperoxid in Methanol, um die endogene Peroxidase des Gewebes abzureagieren. Damit soll eine spätere zwar enzymbedingte, aber unspezifische Reaktion (Dunkelfärbung des Gewebes, "Hintergrund") durch das Chromogen DAB vermieden werden.

### **2. Restitution von Antigenstrukturen (antigen retrieval)**

Dieser Schritt dient der Wiederherstellung möglichst vieler im Gewebe enthaltener, nach Formalin-Einwirkung jedoch oftmals veränderter oder denaturierter Oberflächenantigene (Epitope). Hierzu wurden die Proben zunächst in 50 ml-Bechergläser, die zur Hälfte mit 0,01 molarem Zitratpuffer (zur Herstellung siehe Anhang, Kap. 7) gefüllt waren, umgeben. Die Bechergläser ihrerseits wurden dann schwimmend in einem auf konstant 85 °C vorgeheizten Wasserbad platziert und fortan unter Temperaturkontrolle gehalten.

Nach 20-minütiger Inkubation wurden die Bechergläser mit den darin enthaltenen Gewebeschnitten aus dem Wasserbad genommen und zum Abkühlen auf Raumtemperatur für weitere 20 Minuten stengelassen.

### **3. Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen**

Hierfür wurden die Schnitte erneut gewaschen und anschließend für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Blockierungslösung präinkubiert. Diese Lösung enthielt einen Anteil von 5% Normal-Ziegeserum (normal goat serum, NGS) in TBS-Triton. Dieser Schritt galt der Absättigung unspezifischer Antigene (Epitope) im Gewebe.

### **4. Inkubation mit dem Primärantikörper**

Hierfür wurden die Proben ohne vorheriges Waschen mit dem Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung in PBS-Triton-Lösung über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert (siehe Tab. 2.3-3).

### **5. Inkubation mit dem Sekundärantikörper**

Zunächst wurden die Schnitte gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dafür wurde der Sekundärantikörper 1:200 in TBS-Triton verdünnt (siehe Tab. 2.3-3).

### **6. ABC-Reaktion**

Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte für 120 Minuten mit dem Vectastain® ABC-Kit (Elite) Standard (Vector Laboratories, USA) inkubiert. Wichtig war hierbei, dass die ABC-Kit-Lösung 30 Minuten vor der Anwendung angesetzt werden musste, um zu reifen und damit ein optimales Ergebnis zu erzielen.

Den Herstellerangaben entsprechend wurden für die ABC-Reaktionslösung die beiden in Tropffläschchen gelieferten Komponenten des Kits, Komponente A (Avidin) und Komponente B (Biotin) nach folgendem Prozedere zusammengebracht: in eine Menge von 5 ml TBS-Triton gab man jeweils zwei Tropfen der Komponente A sowie zwei Tropfen der Komponente B. Anschließend wurde diese Lösung gut gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (bis zu ihrer Verwendung) stehen gelassen.

### **7. DAB-Entwicklung**

Hierfür wurden die Schnitte zunächst abermals gewaschen und anschließend für 10 Minuten in Natriumacetatpuffer (sodium acetate buffer, SAB; siehe Anhang, Kap. 10) gegeben. Zur lichtmikroskopischen Visualisierung der Immunreaktion im Gewebe wurde die sogenannte „Glucose-Oxidase-3-3'-Diaminobenzidin(DAB)-Nickel“-

Methode nach Shu et al. (1988) verwendet. Hierfür wurden zwei Reaktionslösungen vorbereitet:

Lösung "A" enthielt 2,5 g Ammoniumnickelsulfathexahydrat in 50 ml SAB und

Lösung "B" bestand aus 0,05 g DAB in 50 ml SAB. Nachdem die beiden Lösungen gemischt waren, kamen folgende Reagenzien in der entsprechenden Reihenfolge unter Einrühren hinzu:

0,2 g D-[+]-Glucose, 0,04 g Ammoniumchlorid und 0,001 g Glucose-Oxidase (Typ VII aus *Aspergillus niger*). Die Reaktionslösung wurde für ca. 30 Sekunden gerührt und danach wurden die Schnitte zur "Entwicklung" in diese Mischung transferiert.

Unter mikroskopischer Kontrolle der zunehmenden Dunkelfärbung wurden die Schnitte zur Beendigung der Immunreaktion in ein Stopp-Bad aus 50% Aqua bidest und 50% TBS-Triton überführt.

Nach Abschluss der Entwicklung wurden die Schnitte auf Chromalaungelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am nächsten Tag in einer aufsteigende Alkoholreihe wie folgt entwässert und für die Eindeckung vorbereitet:

- 50% Alkohol für 5 Minuten
- 70% Alkohol für 5 Minuten
- 98% Alkohol für 5 Minuten
- 100% Alkohol für 5 Minuten
- 100% Alkohol für 5 Minuten

Nach einem abschließenden Bad in Limonen für 30 Minuten wurden die Schnitte mit DPX (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und einem Deckgläschen blasenfrei eingedeckt.

#### Spezifitätskontrollen:

Um die Spezifität der Bindung des primären Antikörpers zu prüfen, wurden für alle Hirnrindenproben an einzelnen Schnitten Kontrollfärbungen durchgeführt:

a) Für die Negativ-Kontrolle wurden die Schritte 1-3 des immunhistochemischen Protokolls normal durchlaufen, die Inkubation mit dem Primärantikörper (Schritt 4) jedoch ausgelassen; stattdessen wurden die Proben direkt mit Schritt 5 weiterverarbeitet. So verblieben die Schnitte bis zur Inkubation mit dem Sekundärantikörper in der Blockierungslösung aus 5% NGS in TBS-Triton. Das Ausbleiben einer Dunkelfärbung während der DAB-Entwicklung und nach der ABC-Reaktion (Schritt 6) zeigte eine fehlende spezifische Immunreaktion in diesen

Kontrollen an und war somit (indirekt) der Beweis für eine zuverlässige Färbung durch den jeweiligen Antikörper unter Normal- Bedingungen.

b) Als Positiv-Kontrolle wurde u.a. die Tatsache gewertet, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper aus einer bereits bestehenden Sammlung von bewährten Antikörpern stammen, welche schon früher auf ihre Qualität getestet worden waren (Labor von Prof. P. Hof, Department of Neuroscience, Mount Sinai School of Medicine, New York). In diesem Labor wurden auch die hier vorgestellten immunzytochemischen Tests durchgeführt. Eine Teilmenge von jedem Lot eines jeden von mir verwendeten Antikörpers war also bereits früher in mittlerweile veröffentlichten neurobiologischen Projekten dieses Labors erfolgreich zum Einsatz gekommen. Darüber hinaus war dort die Spezifität dieser Antikörper auch durch sogenannte *Präabsorptionsversuche* gezeigt worden: nach Zugabe des aufgereinigten, spezifischen Antigens (in Proteinform) im Überschuss zu einer Testlösung des betreffenden Antikörpers wurde dieser vorab durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion vollständig verbraucht (also präabsorbiert) und dadurch für eine später durchgeführte Reaktion unter Normalbedingungen (also an Gewebeschnitten) unwirksam gemacht. Das Ausbleiben einer jeden Färbung lieferte so den Nachweis der Antikörper-Spezifität; Für weiterführende Details zur Positiv-Kontrolle an den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörpern siehe Nimchinsky et al. (1997), Hof et al. (1999), Hof et al. (2000) sowie Sherwood et al. (2009).

## **2.4 Die histologische Feinanalyse des Kortexmaterials**

Im folgenden Abschnitt wird die histologische Auswertung der Kortexproben genauer erläutert. Diese erfolgte einerseits auf der Basis einer vergleichend qualitativ-morphologischen Gegenüberstellung der jeweiligen Hirnareale, andererseits auf der Grundlage eines quantitativ-stereologischen Ansatzes.

### **2.4.1 Schichtengliederung und Zellmorphologie**

Diese Analyse der Kortex-Architektur wurde nach folgendem Prinzip durchgeführt: in einer Synopsis wurden repräsentative Ausschnitte (fotografische Details bei definierten Maßstäben) von allen vier spezifisch gelabelten primären Rindenarealen (A1, M1, S1, V1) der einzelnen Säugetiere zusammengefügt. Dabei sind Maßstab, Färbung und Ausschnitt eines jeden Bildes innerhalb einer Bildtafel so gewählt, dass



der Betrachter einen unmittelbaren Vergleich ziehen kann, mit lediglich einer einzigen Variablen: entweder variiert die jeweilige Säugetierart (dann interspezifischer kortikaler Vergleich) oder das jeweilige Areal ändert sich (dann intraspezifischer kortikaler Vergleich).

Bei der nachfolgenden quantitativen Auswertung der Nissl-Schnitte verschiedener Säugetiere muss unbedingt auf die Dicke der bearbeiteten Schnitte geachtet werden. Dabei ergeben sich drei Gruppen: Während 1) das Gehirn des La Plata-Delphins (*Pontoporia blainvillei*) in Paraffin eingebettet wurde und bei 20µm Dicke geschnittene histologische Präparate umfasst, wurde 2) das Material der Sammlung G. Pilleri im Naturmuseum und Forschungsinstitut Senckenberg (Glattschweinswal, Amazonas-Delphin, Gemeiner Delphin, Großer Tümmler) stets in Celloidin eingebettet und bei 35µm geschnitten [die Punkte 1) und 2) sind Museumsleihgaben, s. Tab. 2.2-1 und 2.2-2]. 3) Die beiden Kortexproben der stereologischen Analyse (Schweinswal, Großer Tümmler) wurden exakt gleich behandelt und bei 60 µm gefriergeschnitten [wie auch die Proben der übrigen Gehirne von Schwein, Schaf, Hund, Gorilla und Mensch; die Kortexproben aus 3) wurden allesamt eigens für die vorliegende Untersuchung frisch bearbeitet, s. Tab. 2.2-3]. Dies gilt es im Blick zu behalten, wenn Spezies miteinander auf ihre Kortex-Zelldichte verglichen werden sollen. Daraus ergibt sich für unsere Analyse, dass die Nissl-Schnitte der Gruppen 2) und 3) jeweils innerhalb ihrer Gruppe (da identisch behandelt) ohne Einschränkung miteinander verglichen werden können, während Vergleiche vor allem quantitativer Natur zwischen diesen Gruppen mit Sorgfalt angestellt werden müssen.

#### **2.4.2 Design-basierte Stereologie**

Der Begriff “*Stereologie*“ bezieht sich auf die räumliche Interpretation von Schnitten durch Körper im Hinblick auf deren Zusammensetzung (hier Partialvolumina, Dichte von Komponenten etc.). Design-basiert bedeutet nun, dass die stereologische Untersuchung des Nissl-gefärbten Proben-Materials einem bestimmten, im Vorhinein streng festgelegten Schema folgt. Durch diese a priori- Herangehensweise sollen systematische Fehler (bias) minimiert und vernachlässigbar klein gehalten werden. Solche Fehler treten dann auf, wenn der Untersucher mangels ausreichender Objektivität bzw. in Folge von Voreingenommenheit die Untersuchung im Ergebnis bewusst oder unbewusst verfälscht, also letztlich entwertet.

Anwendung fand die Methodik der design-basierten Stereologie in der vorliegenden Studie für folgenden Ansatz: mit ihrer Hilfe sollte die Dichte von Neuronen in bestimmten Schichten verschiedener Kortexareale möglichst genau ermittelt werden. Dazu wurden die entnommenen Gewebelöckchen (in Form von Partialschnittserien) mit zwei verschiedenen Einzelmethode bearbeitet, die in ihrer Kombination dann anschließend Dichteberechnungen zuließen.

1) In jeder Serie von histologischen Präparaten aus einem bestimmten Neokortex-Areal (region of interest, ROI) wurden an systematisch ausgewählten Schnitten zuerst die Neuronen in definierten Kompartimenten (Disektoren, s.u.) gezählt. Hierfür kam der „Optical Fractionator“ der Stereologie-Software MBF Bioscience Stereo Investigator<sup>®</sup> (MicroBrightField, Inc., Williston, USA) zum Einsatz (siehe Kap. 2.4.2.2).

2) Dabei wurden die Ergebnisse des zuvor in systematisch ausgewählten Einzelschnitten numerisch untersuchten Rindenareals in seiner dreidimensionalen Ausdehnung (Volumen) über die Gesamtzahl der berücksichtigten Einzelschnitte hinweg integriert. Hierfür wurde die Untersuchungsmethode „Cavalieri Probe“ der Stereologie-Software MBF Bioscience Stereo Investigator<sup>®</sup> angewendet (siehe Kap. 2.4.2.3).

3) Um aus diesen beiden Methoden und deren Ergebnissen letztendlich Dichtewerte zu erhalten, wurde für jedes der untersuchten Rindenareale die jeweilige Neuronenzahl (ermittelt in Punkt 1, s.o.) durch das zugehörige Kortextvolumen (ermittelt in Punkt 2, s.o.) dividiert. Allerdings ist zu bedenken, dass diese stereologische Analyse strenggenommen nur Schätzwerte und keine Absolutwerte liefern kann. Bei der Ermittlung von Neuronendichten in verschiedenen Arealen nach dieser Methode bedeutet dies jedoch keine Einschränkung der Aussagekraft der Ergebnisse, da in den untersuchten Arealen Ungenauigkeiten bzw. methodisch bedingte „Fehler“ bei ausreichender Disektorenzahl und damit letztlich ausreichender Neuronenzahl vernachlässigbar gering werden sollten.

#### **2.4.2.1 Methodische Voraussetzungen**

Für die korrekte Durchführung einer solchen rational konzipierten stereologischen Untersuchung nach allgemein anerkannten Gültigkeitskriterien sind einige Grundvoraussetzungen zu erfüllen (Schmitz und Hof 2000, 2005):

1) Die untersuchten Proben sollen repräsentativ sein. Dies bedeutet, dass sie das Herkunftsgewebe in seiner Gesamtheit repräsentieren. In der vorliegenden Studie wurde dieser Bedingung dadurch entsprochen, dass die entnommenen Kortexblöckchen ausschließlich aus jeweils einem der zu untersuchenden Areale (M1, S1, A1, V1) der Großhirnrinde stammen. Dafür wurden die in der neurophysiologischen Literatur vorhandenen Begrenzungen der Hirnrindenareale beachtet (s. Kap. 2.3.1). Jede entnommene und später untersuchte Kortexprobe war lediglich Teil *eines* bestimmten Hirnrinden-Areals und somit als stellvertretend hierfür zu betrachten.

2) Für die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben miteinander ist darauf zu achten, dass die äusseren Bedingungen bei ihrer histologischen Bearbeitung (Fixierung, Einbettung, Schneiden und Färben) möglichst identisch sind, um Schrumpfungsartefakte und andere Fehlerquellen wie Zerreissungen des Gewebes in tolerablen, möglichst konstanten Grenzen zu halten. Dieser Forderung wurde bei der Bearbeitung sämtlicher Gewebeproben von der Entnahme bis hin zur Färbung entsprochen (zur genaueren Erläuterung siehe auch Kap. 2.3.2 bis 2.3.5).

3) Die Kortexschnitte müssen eine gewisse Mindestdicke aufweisen, um anschließend ausreichend Spielraum für die Festlegung der oberen und unteren Grenzfläche eines jeden quader-ähnlichen Untersuchungsraumes (Quadratsäule; Disektor oder virtual counting space) in der Z-Achse (Disektor-Höhe, DH) zu gewährleisten. Zum anderen muss jeder Gewebeschnitt im Vorfeld statistisch gesehen die gleiche Chance haben, zu den Ergebnissen der Analyse beizutragen (systematically and randomly selected, SRS, s.u.).

Um bei dem vorliegenden Projekt eine ausreichende Schnittdicke für den Untersuchungsraum (DH) zu gewährleisten, wurden für die statistische Analyse sämtliche Proben mit einem Mikrotom (Jung Histoslide 2000R, Leica, Deutschland) in der am Gerät eingestellten Dicke (Abkürzung: **d**) von 60 µm geschnitten. Für stereologische Studien an Ratten und Mäusen haben sich 30-60 µm dicke Schnitte bewährt (Glaser et al. 2007). Interessanterweise zeigten die bei einer Einstellung von 60 µm am Mikrotom gewonnenen Schnitte bei der stereologischen Analyse und Nachmessung mittlere Schnittdicken (Abkürzung: **MGS**) von ca. 30-35 µm. Dies kam dadurch zustande, dass das Gewebe durch den Kontakt mit den Lösungen während der Kresylviolett-färbung merklich geschrumpft war. Deshalb wurde die tatsächliche Schnittdicke bei jeder einzelnen Zählposition (site) neu gemessen. Dadurch ergaben

sich am Ende einer jeden Zählung verlässliche Durchschnittswerte für die anschließenden Berechnungen.

Um das Kriterium der statistischen Chancengleichheit auf Repräsentation der einzelnen Schnitte mit ihren Neuronen im Gesamtergebnis zu gewährleisten, wurden die Schnitte mit System und doch zufällig stichprobenartig ausgewählt (systemic-random sampling, SRS). Dabei ist zu beachten, dass der Abstand zwischen den ausgewählten Einzelschnitten, also die Schnittperiodizität (Abkürzung: **p**) über die gesamte Schnittserie hinweg konstant bleibt. In der vorliegenden Untersuchung wurde dies dadurch erreicht, dass einem willkürlich gewählten Anfangsschnitt (Abkürzung: **a**) stets die Schnitte mit dem Schnittabstand zehn ( $p=10$ ), also Schnitte mit der Nummer  $a+10$ ,  $a+20$ ,  $a+30$  (jeder zehnte, zwanzigste, dreissigste) usw. folgten, bis das Ende der Schnittserie des betreffenden Gewebeblocks erreicht war.

Als Beispiel hierfür soll das Areal A1 des Großen Tümmlers (*Tursiops truncatus*) TT133 dienen. Das Schneiden des Gewebeblocks aus dem Areal A1 am Kryotom ergab 109 Schnitte. Nach der zufälligen Auswahl des Schnittes Nummer zehn als Anfangsschnitt wurden darauf folgend die Schnitte mit der Nummer 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100 für die stereologische Analyse verwendet.

Weiterhin musste die Färbung der Schnitte so erfolgen, dass sämtliche Neuronen im Zielgebiet tingiert wurden, um auf diese Weise mit der gleichen Wahrscheinlichkeit zum Endergebnis beitragen zu können. Wie bereits oben erwähnt, wurden die jeweiligen Schnitte für diesen Zweck mit Kresylviolett (Nissl) gefärbt. Diese Übersichtsfärbung ermöglicht die gleichmäßige Darstellung und Erfassung der Neuronen für eine optimale Auswertung des Gewebes (Heinsen et al. 2000).

Um die technischen Voraussetzungen für eine design-basierte Stereologie zu erfüllen, muss ein computergestütztes Mikroskop mit Spezialsoftware verwendet werden. Diese Software dient dazu den Untersucher bei der Durchführung der Analyse zu unterstützen und anschließend die mathematische Auswertung des Experiments zu übernehmen (Genaueres zur technischen Ausrüstung siehe Kap. 2.6).

Im Vorfeld der eigentlichen Untersuchung wurde eine Pilotstudie am Originalmaterial durchgeführt; Ziel war die Erarbeitung geeigneter Parameter für die spätere stringente Anwendung der Stereologie-Software.

Als Maß für die Genauigkeit einer stereologischen Untersuchung gilt der Fehlerkoeffizient (coefficient of error, Abkürzung: **CE**). Für jedes beliebige Zielgebiet

berechnet er sich aus dem Kehrwert der Quadratwurzel der Summe aller ermittelten Zähleinheiten (Abkürzung:  $\Sigma n$ ) im jeweiligen Zielgebiet:

$$CE = 1 / \sqrt{\Sigma n}$$

Bei der Bestimmung der Neuronenzahl (unter Verwendung des Optical Fractionator, siehe Kap. 2.4.2.2) entspricht eine Zähleinheit (Abkürzung: **n**) dem Nucleolus eines Neurons. Für die Bestimmung von Volumina (unter Verwendung der Cavalieri-Methode, siehe Kap. 2.4.2.3) entspricht eine Zähleinheit einem Gitternetzschneitpunkt innerhalb des untersuchten Gebietes (region of interest, **ROI**). In der praktischen Anwendung der Stereologie-Software wurde eine einzelne Zähleinheit durch Klicken mit dem Maus-Cursor an der entsprechenden Stelle im Rindengrau erfasst.

Die Wahrscheinlichkeit, dass mit dieser Methodik ermittelte Werte tatsächlich auch den Realwerten entsprechen, liegt bei ca.  $95\% \pm 2 * CE$ . In bisherigen Studien wurde ein CE von kleiner als 0,1 ( $CE < 0,1$ ) als verlässlich erachtet (Schmitz und Hof 2000, 2005; Eriksen und Pakkenberg 2007). Dies entspricht einer Gesamtzahl von mindestens 200, besser jedoch 250-400 zu markierenden Zähleinheiten pro untersuchter Kortexregion.

Die in der Pilotstudie ermittelten Parameter, welche insgesamt einen zulässigen CE-Bereich lieferten, wurden anschließend zur Durchführung der eigentlichen Arbeit konstant angewendet.

#### **2.4.2.2 Bestimmung der Neuronenzahl mit dem „Optical Fractionator“**

##### Theoretischer Hintergrund:

Für die PC- gestützte Berechnung von Schätzwerten der Neuronenzahl in den untersuchten Kortexproben wurde die Methode „Optical Fractionator“ der Stereologie-Software MBF Bioscience Stereo Investigator® (MicroBrightField, Inc., Williston, USA) angewendet. Ihr liegt die Zählung sämtlicher Neuronen eines bestimmten Zielgebiets [Region Of Interest, Abkürzung: **ROI**; Eine Übersicht zu allen für die Stereologie relevanten, deshalb fettgedruckten Abkürzungen befindet sich am Ende dieses Kapitels in Tab. 2.4-3.] innerhalb eines vordefinierten, dreidimensionalen Zählraumes (Disektor, optical disector, oder virtual counting space) zugrunde. Dieser Zählraum besitzt eine gewisse, im Vorhinein festgelegte Länge (in der X-Achse), Breite (in der Y-Achse) und Tiefe (in der Z-Achse), ähnlich einem Würfel (Quadratsäule). Die Länge und Breite dieses 3D-Zählraumes bilden gemeinsam den zweidimensionalen Zählrahmen (Abkürzung: **ZR**). In der Betrachtung von oben

(zweidimensional!) sieht man also die Länge des Zählrahmens (Abkürzung: **X-ZR**) sowie seine Breite (Abkürzung: **Y-ZR**). Die ebenfalls im Vorfeld festgelegte Tiefe des gesamten dreidimensionalen Zählraumes in der Z-Achse, die sogenannte Disektor-Höhe (Abkürzung: **DH**), wird erst mit Hilfe des Z-Achsen-Rädchens am Joystick optisch erschließbar (s. Kap. 2.5).

Um Schnittartefakte am Rand der Gewebeproben von der Zählung auszuschließen, wird die eigentliche Disektor-Höhe **DH** (also die Z-Achse des Zählraumes) so eingerichtet, dass zwei virtuelle Sicherheitszonen (guard zones) das Zielgebiet jeweils von oben (top guard, Abkürzung: **TG**) und von unten (bottom guard, Abkürzung: **BG**) her begrenzen.

Über die Plazierung eines solchen 3D-Zählraumes im Zielgebiet entscheidet ein zufällig auf den histologischen Schnitt projiziertes 2D-Gitternetz (systematic random sampling grid, SRS grid) mit einer konstanten Kantenlänge der einzelnen Gitternetz Kästchen (Abkürzung: **GK**); das Gitternetz ähnelt einem Schachbrett (hier dem grid), das aus einzelnen Feldern (hier den Gitternetz Kästchen) gebildet wird. Die Kantenlänge dieser Gitternetz Kästchen in der X-Achse (**X-GK**) und Y-Achse (**Y-GK**) wird ebenfalls im Vorhinein festgelegt.

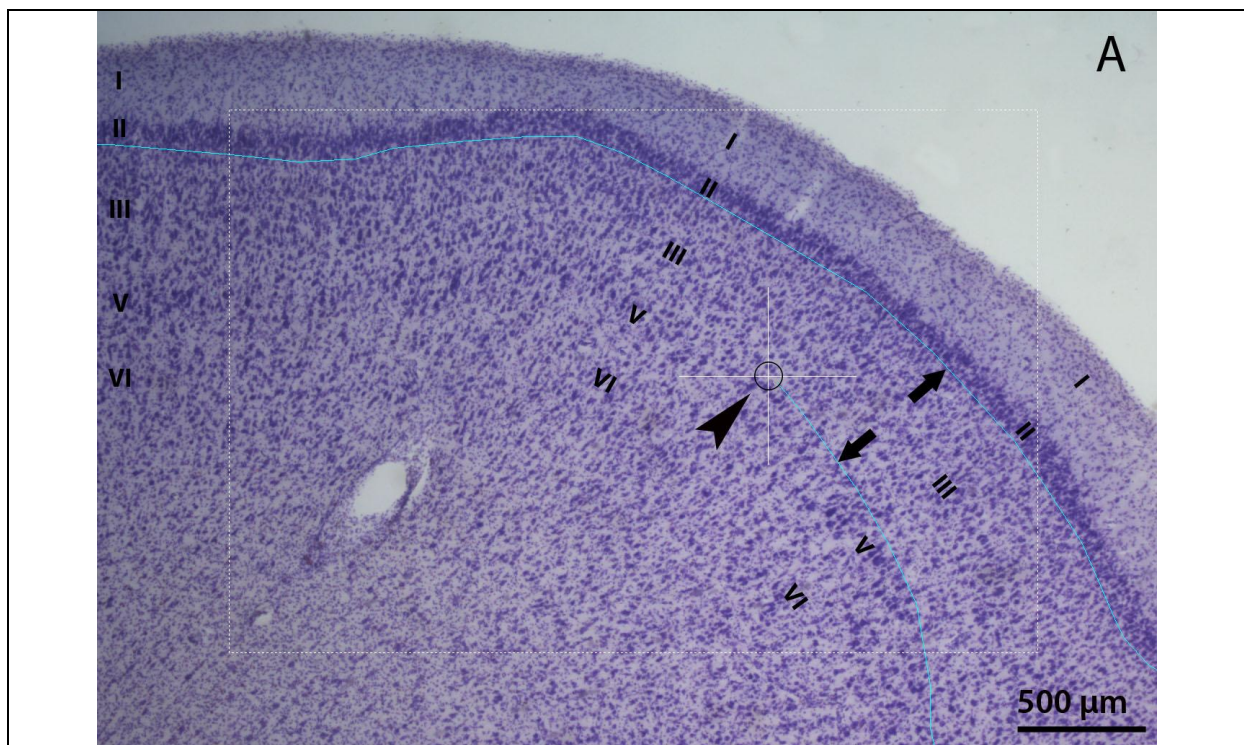
Als definierte Zähleinheit diente in dieser Studie der Nucleolus eines Neurons. Zellen wurden nur dann als Neuronen gewertet, wenn sie einen klar erkennbaren Nucleus mit hellem Cytoplasma und einem dunklen Nucleolus besaßen. Zur Unterscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen diente der Größenunterschied der beiden Zellarten sowie das Fehlen von Nissl-Schollen und deutlichen Nucleoli auf Seiten der Gliazellen.

Allerdings wurde der Nucleolus eines Neurons nur dann markiert und somit gezählt, wenn er zwei Kriterien erfüllte: zum einen musste er innerhalb der Disektor-Höhe **DH** (Z-Achse des 3D-Untersuchungsraumes) im Fokus erscheinen. Zum anderen musste der Nucleolus auch innerhalb des Zählrahmens liegen, oder er durfte äusserstenfalls nur die grüne Einschluss-, nicht jedoch die rote Ausschlusslinie von innen berühren (s. Abb. 2.4-3). Diese Ein- und Ausschlusslinien dienen der Vermeidung von Mehrfachzählungen durch Überschneidungen von benachbarten Zählrahmen.

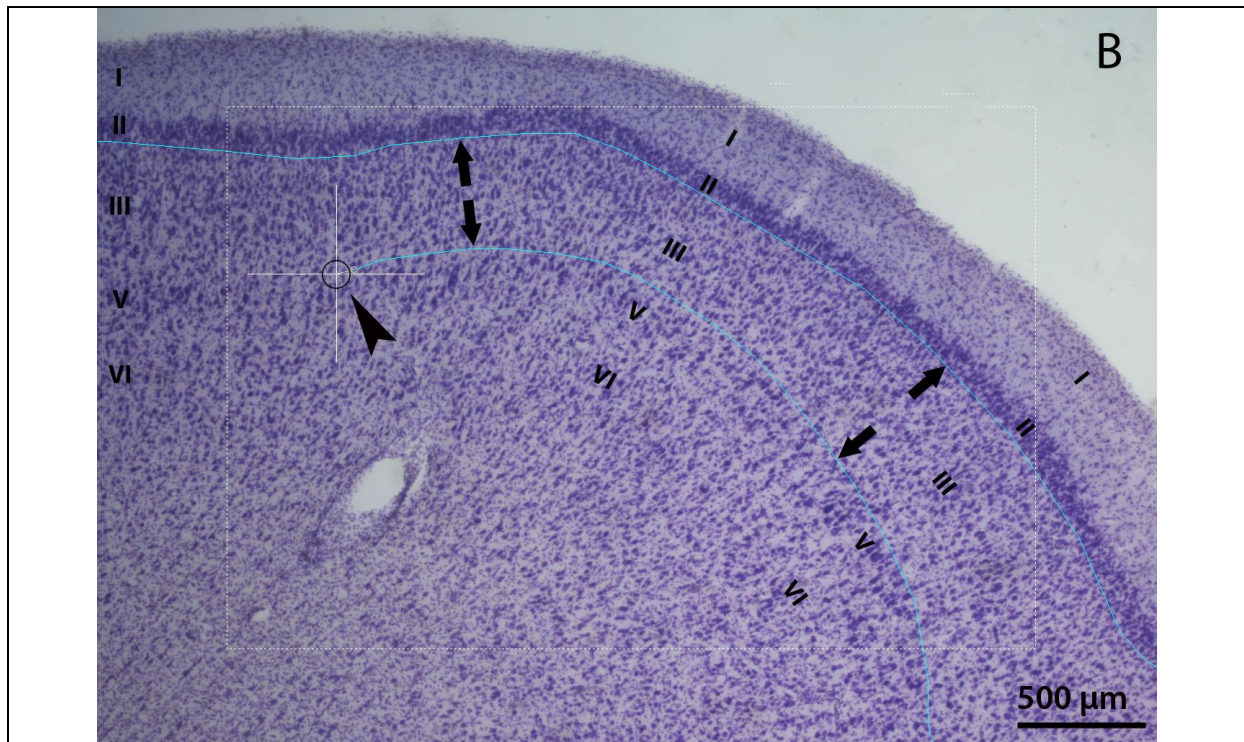
#### Zur praktischen Durchführung in der vorliegenden Studie:

Um zunächst das Zielgebiet (**ROI**) im jeweiligen Gewebeschnitt zu markieren, wurde im Programm-Menü unter der Software-Rubrik „Trace a contour“ das zu

untersuchende Gebiet festgelegt. Dafür wurde bei 25-facher Vergrößerung (= 2,5-faches Objektiv mit 10-fachem Okular) das mit der Digitalkamera aufgenommene Echtzeitbild auf den Computer-Bildschirm übertragen und dort mit Hilfe des Maus-Cursors die Kontur der ROI eingezeichnet (siehe Abb. 2.4-1). Dabei wurden die Grenzen der jeweiligen Kortex-Schichten möglichst genau eingehalten. Als Vorlage für die regelhafte Abgrenzung der Schichten voneinander wurden histologisch-zytologische Abbildungen (Nissl) des Kortex von Cetaceen in der Literatur verwendet (z.B. Glezer et al. 1991). Um die Orientierung im Schnitt zu garantieren und das Einzeichnen der Kontur eindeutig festzulegen und jederzeit weiterführen zu können, wurde am ersten untersuchten Schnitt einer jeweiligen Schnittserie ein virtueller Referenzpunkt (Abkürzung: **RP**) gesetzt und abgespeichert. Mit Hilfe dieses Punktes war es möglich, die Software-Kontur stets aufs Neue exakt mit dem realen Gewebeschnitt im Kamerabild zusammenzuführen. Abbildung 2.4-1 zeigt an einem Beispiel, wie die Kontur regelrecht in das histologische Bild eines Kortexschnittes eingezeichnet wurde.







**Abb. 2.4-1: Beispiel für das Einzeichnen einer Umrandung (Tracing) um Schicht III in einem kresylgefärbten Hirnrinden-Schnitt (primär somatosensibles Areal) beim Großen Tümmler. Screenshot.**

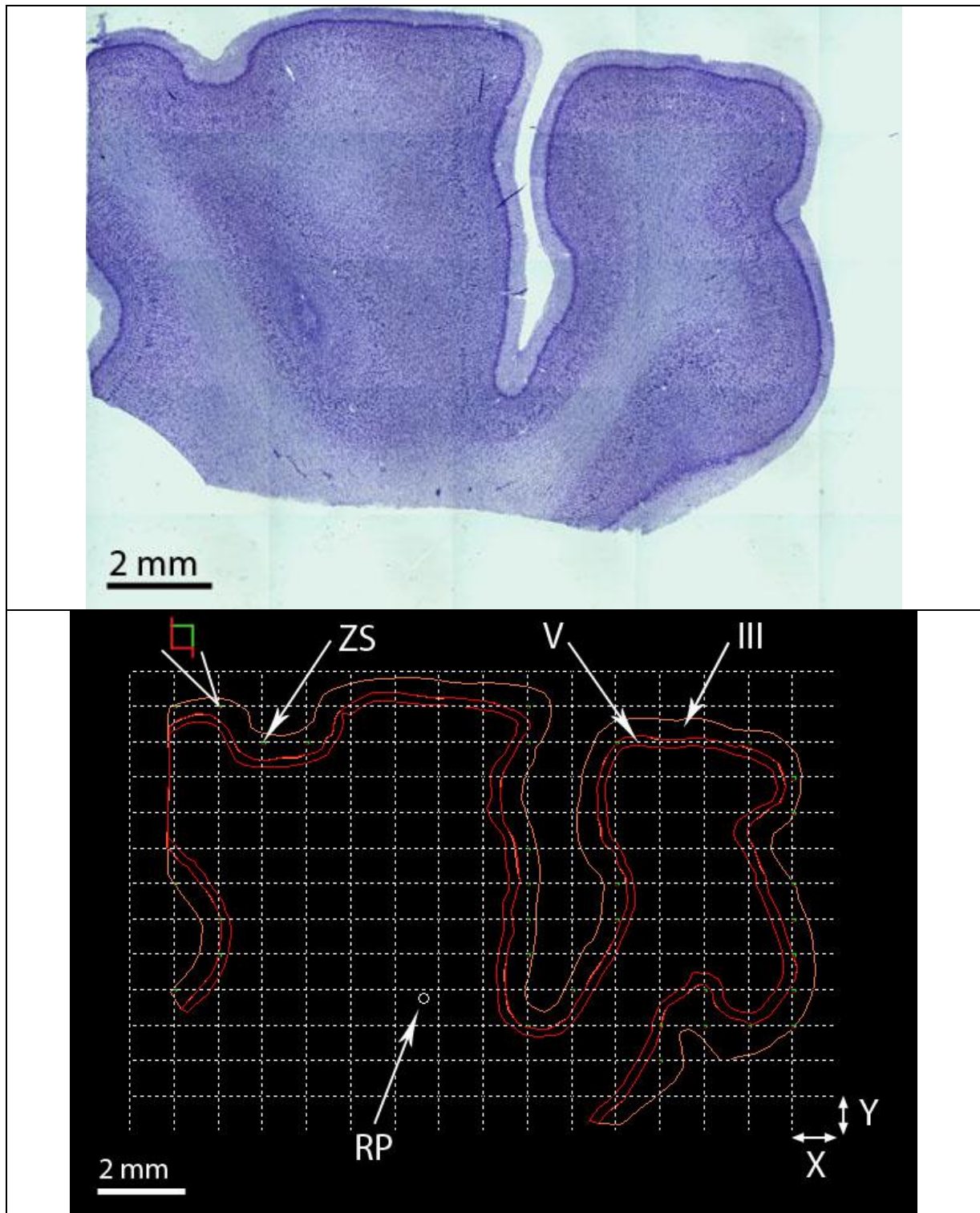
A) Bei 25-facher Vergrößerung werden mit Hilfe des Maus-Cursors (Pfeil-Spitze) parallele Konturen (blaue Linien) außen und innen entlang der Hirnrinden-Schicht III eingetragen (entgegengesetzte Pfeile), einmal an der Grenze zu Schicht V und einmal an der Grenze zu Schicht II.

B) Im weiteren Verlauf wird durch Bewegen des Maus-Cursors (Pfeil-Spitze) das Eintragen der inneren Kontur von Schicht III (Pfeile) fortgesetzt.

Abkürzungen: I-VI: Hirnrindenschichten I-VI.

Nach der Abgrenzung des Zielgebiets wurden die zur Zählung notwendigen Zählstellen (sites) ermittelt. Hierfür wurde in der Übersicht ein virtuelles Gitternetz (mit einer zuvor festgelegten Rastergröße) auf den histologischen Schnitt projiziert. An den Schnittpunkten des Gitternetzes mit den Konturen der zu untersuchenden ROI (Rindengrau) wurden dann die jeweiligen Zählstellen durch die Software eingeblendet (siehe Abb. 2.4-2).





**Abb. 2.4-2: Einblendung des Gitternetzes auf die Konturen der Zielregion für die Festlegung der Zählstellen (sites) in einem histologischen Hirnrindenschnitt (primär motorisches Areal, M1) beim großen Tümmler. Screenshot.**

Das obere Bild zeigt den kresylgefärbten Schnitt in der Übersicht, welcher aus hier schwach erkennbaren Einzelbildern (2,5-faches Objektiv) zusammengesetzt wurde.

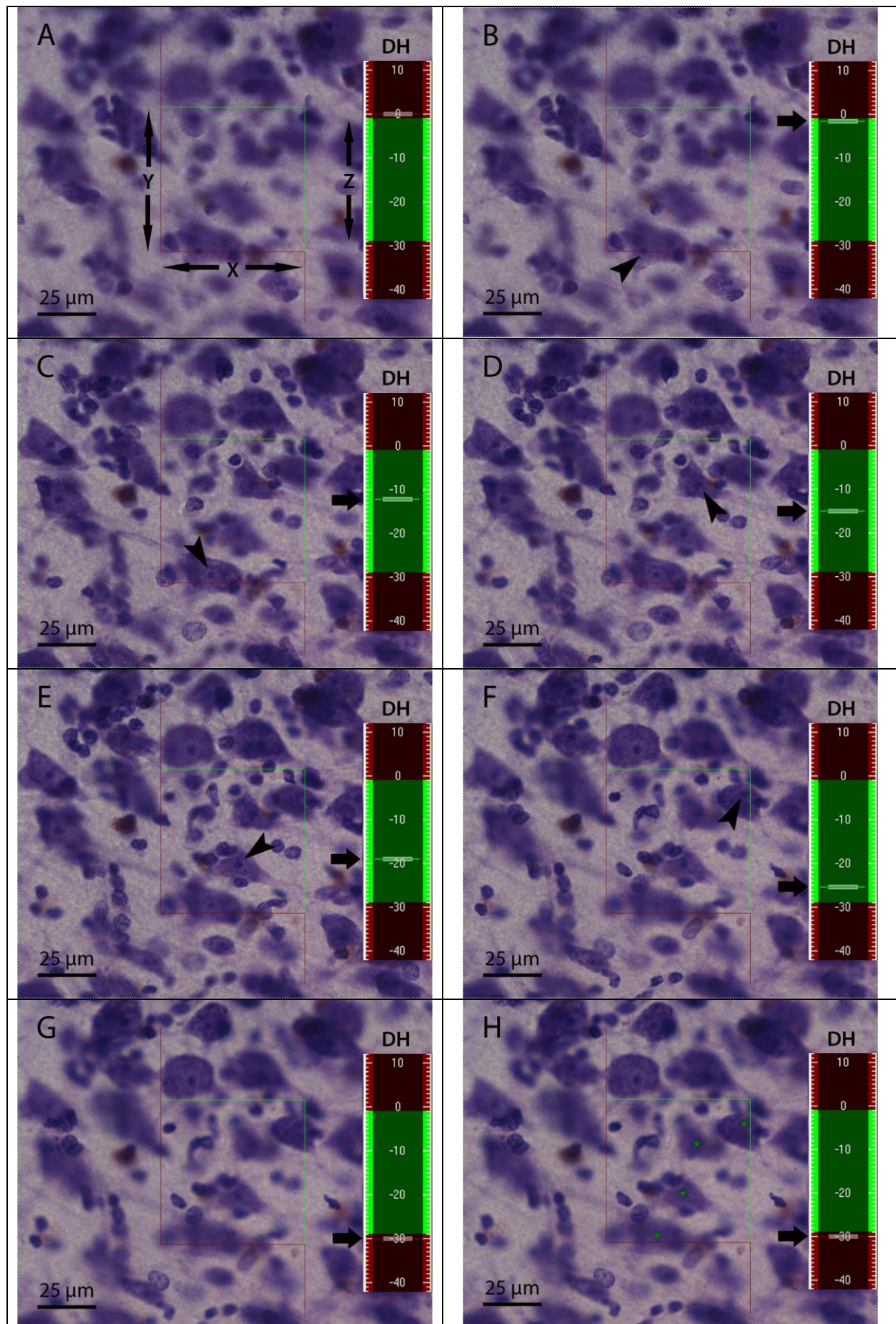
Das untere Bild zeigt das eingeblendete Gitternetz über den zuvor manuell um die Hirnrinden-Schichten III und V (III, V) eingezeichneten Konturen (orange umrandet Schicht III, rot umrandet Schicht V) des korrespondierenden Ausschnitts darüber (Nissl-Bild). Die Kästchen dieses Gitternetzes besitzen eine gewisse Größe in X- und Y-Richtung (X, Y). Im Beispiel sind dies für X: 1000  $\mu\text{m}$  und für Y: 800  $\mu\text{m}$ . Die Zählstellen [in diesem Beispiel ist eine Zählstelle (ZS, Originalgröße; links davon vergrößert) exemplarisch bezeichnet] treten

immer dort auf, wo die linke, obere Ecke eines Gitternetzkästchens innerhalb der Kontur um eine Zielregion (in diesem Beispiel um Schicht III) liegt. An diesen Zählstellen wird dann der Zählrahmen mit seinen grünen Einschluss- und roten Ausschlusslinien in den Schnitt eingeblendet (zur Verdeutlichung ist eine Zählstelle als vergrößertes Inset im linken, oberen Bildteil gezeigt). Ebenfalls sichtbar ist der für das definierte Einzeichnen der Konturen festgelegte Referenzpunkt (RP), der es nach Unterbrechungen in der Datenerfassung erlaubt, die Konturen immer wieder exakt über das Echtzeitbild des histologischen Schnittes zu projizieren.

Nach der Erfassung der Konturen wurde am Mikroskop auf 400-fache Vergrößerung (= 40-faches Objektiv mit 10-fachem Okular) umgestellt und mit der Quantifizierung der Neuronen innerhalb des 3-D- Zählraumes (Disektor) begonnen. Für das eigentliche Zählen wurde der Untersucher (Cursor) mit Hilfe der motorisierten Objektträger-Plattform automatisch zu den entsprechenden Zählstellen im histologischen Schnitt hin verschoben (siehe Abb. 2.5-1).

Für das Erfassen von Zähleinheiten konnte der virtuelle Disektor (Zählraum) mit Hilfe des speziellen 3-Ebenen- Joysticks in allen drei Ebenen begutachtet werden (siehe ebenfalls Abb. 2.5-1). Dadurch kann der Schnitt motorisiert sowohl entlang der X- und Y-Achse, also vor und zurück, von links nach rechts als auch durch das Z-Achsen-Rädchen (Z-Achse) vertikal auf und ab bewegt werden. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den verschiedenen Kortexschnitten zu gewährleisten, wurde jeweils zu Beginn einer jeden Zählung die Dicke des Schnittes manuell gemessen. Hierbei wurde beim Durchfokussieren durch das Gewebe mit Hilfe des Z-Achsen-Rädchens am 3-DJoystick und des Z-Achsen-Sensors am Mikroskop jeweils die Ober- und die Unterkante des Schnittes ermittelt und dadurch die tatsächliche Dicke einer jeden Kortexprobe immer wieder kontrolliert. In Abbildung 2.4-3 wird das Vorgehen bei der Erfassung von Zähleinheiten (hier Nucleoli von Neuronen) im 3-D-Zählraum im Detail gezeigt.





**Abb. 2.4-3: Procedere bei der Erfassung von Zählseinheiten (Nucleoli) in einem**

**dreidimensionalen Zählraum (Disektor) bei 400-facher Vergrößerung am Beispiel des primär somatosensiblen Areals (S1) beim großen Tümmler. Screenshot.**

A) An einer durch die Software ausgewählten Zählstelle (site; ZS in Abb. 2.4-2) werden der Zählrahmen (vgl. vergrößertes Inset in Abbildung 2.4-2) und die Disektor-Höhe (diese Abbildung; DH, in  $\mu\text{m}$ ) eingeblendet. Die Kanten des horizontal orientierten Zählrahmens (X und Y) besitzen in diesem Beispiel eine Länge von jeweils 60  $\mu\text{m}$ . Sie begrenzen den Zählraum zweidimensional in Länge (X) und Breite (Y) und sind farblich als grüne Einschluss- und rote Ausschlusslinien erkennbar. Durch den Objektivwechsel erscheint der Zählrahmen nun im Vergleich mit dem in Abbildung 2.4-2 exemplarisch gezeigten deutlich vergrößert. Die Disektor-Höhe (DH) schließlich begrenzt den Zählraum in der Tiefe, also entlang der Z-Achse (Z); sie erschließt sich über das Z-Achsen-Rädchen am 3-D Joystick (siehe Text). Die Software zeigt die Z-Achse von +12  $\mu\text{m}$  bis -42  $\mu\text{m}$  an, die zum Zählen erlaubte DH beträgt jedoch nur 28  $\mu\text{m}$  (grünes Segment von -1  $\mu\text{m}$  bis -29  $\mu\text{m}$ ). Von 0  $\mu\text{m}$  bis -1  $\mu\text{m}$  und von -29  $\mu\text{m}$  bis -30  $\mu\text{m}$  sind jeweils die beiden Schutzzonen (top und bottom guard) aufgelagert (siehe Text). Die DH (grauer horizontaler Balken) steht in A) bei 0  $\mu\text{m}$ . Insgesamt also entspricht der dreidimensionale Zählraum/Disektor einem Schacht, dessen Aufsicht von oben (X/Y-Ebene) durch den Zählrahmen mit seinen grünen Einschluss- und roten Ausschlusslinien begrenzt wird (linker Bildteil) und dessen Tiefe/Tiefenstand entlang der Z-Achse der angezeigten Disektor-Höhe (DH, grauer Balken in der rechten Bildhälfte) entspricht.

B) Beim optischen Eintreten in den virtuellen Zählraum erscheint bei ca. -1  $\mu\text{m}$  Tiefe (Pfeil) der Nucleolus eines Neurons im Fokus (Pfeilspitze). Dieser Nucleolus liegt jedoch auf einer der beiden roten Ausschlusslinien des Zählrahmens und wird somit nicht erfasst und gezählt.

C) Bei ca. -12  $\mu\text{m}$  Tiefe im Zählraum (Pfeil) erscheint ein weiterer Nucleolus im Fokus (Pfeilspitze). Dieser erfüllt nun alle erforderlichen Zähl-Kriterien. Er erscheint innerhalb der festgesetzten Disektor-Höhe, liegt innerhalb des Zählrahmens und wird deshalb erfasst (siehe H).

D) Bei ca. -15  $\mu\text{m}$  Tiefe der Disektor-Höhe (Pfeil) erscheint ein weiterer Nucleolus eines Neurons im Fokus (Pfeilspitze) und wird ebenso erfasst (siehe H).

E) Bei ca. -19  $\mu\text{m}$  Disektor-Höhe (Pfeil) erneut ein zu erfassender Nucleolus (Pfeilspitze).

F) Der zu erfassende Nucleolus in dieser Abbildung (Pfeil-Spitze) erscheint bei ca. -26  $\mu\text{m}$  der Disektor-Höhe (Pfeil).

G) Nach Durchwanderung der Schärfenebene bis ca. -30  $\mu\text{m}$  Disektor-Höhe (Pfeil) wird der Zählraum samt 'bottom guard' verlassen.

H) Abschließend gezeigt sind die vier mit dem Maus-Cursor erfassten/ markierten Nucleoli (kleine grüne Sterne) aus C), D), E) und F) in diesem Zählraum. Jede dieser gesetzten Markierungen entspricht einer Zähleinheit (n), mit deren Hilfe die Software anschließend Schätzwerte für Neuronenzahlen berechnet. Weiteres hierzu im Text.

Um nach der Erfassung aller Zähleinheiten ( $\sum n$ ) einen Schätzwert der Gesamt-Neuronenzahl ( $N_{\text{total}}$ ) liefern zu können, verwendet die Software folgende drei Parameter:

1) den zahlenmäßigen Anteil der periodisch untersuchten Schnitte (also die Schnittperiodizität  $p$ ) an der Gesamtzahl der zur Verfügung stehenden Schnitte, bei jedem p-ten Schnitt also  $1 / p$ , die sogenannte "section sampling fraction" (**SSF**).

2) das Verhältnis der Fläche des Zählrahmens (ZR; counting frame) in der X/Y-Ebene (also X-ZR mal Y-ZR), d.h. also der Aufsichtfläche des Disektors (Zählstelle; Abbildung 2.4-2 und 2.4-3) zur Fläche der einzelnen Gitternetz Kästchen (GK; weiße,

gestrichelte Kästchen in Abbildung 2.4-2) auf der X- und Y-Achse (also X-GK mal Y-GK), die sogenannte “area sampling fraction“ (**ASF**).

3) den jeweiligen Anteil der Disektor-Höhe (**DH**, siehe Abb. 2.4-3) an der insgesamt gemessenen durchschnittlichen Probendicke (mittlere gemessene Dicke des Hirnrindenschnittes, **MGS**) in der Z-Achse, die sogenannte “thickness sampling fraction“ (**TSF**).

Das Produkt aus der Anzahl der erfassten Zähleinheiten  $\sum n$  (Nucleoli) mit den Kehrwerten von **SSF**, **ASF** und **TSF** ergibt schließlich den Schätzwert der Neuronenzahl **N<sub>total</sub>** im untersuchten Gebiet:

$$N_{\text{total}} = \sum n * (\text{SSF} * \text{ASF} * \text{TSF})^{-1} \quad (\text{Glaser et al. 2007})$$

Zum besseren Verständniss zeigt die folgende Tabelle am Beispiel des Großen Tümmlers die stereologische Berechnung der Gesamtneuronenzahl in einer Zielregion (Schicht III, primärer Motorkortex) mit Hilfe des 'optical fractionator'.

Diese Zahl steht also für die erfassten Zähleinheiten (Neuronen) in dem betreffenden Teil-Rindenareal (ROI) noch unbekannten Volumens. Das zugehörige Volumen wird im nächsten Abschnitt (s. Kap. 2.4.2.3, Cavalieri Probe) ermittelt, um die Neuronendichte zu berechnen.

**Tab. 2.4-1** Beispiel der Parameter zur Berechnung der Neuronenzahl

<u>Im Vorfeld festgelegte Parameter</u>	<u>Wert</u>	<u>Während der Zählung ermittelte Parameter</u>	<u>Wert</u>
Zählrahmen in X-Achse (X-ZR) [ $\mu\text{m}$ ]	60	Mittlere, gemessene Schnittdicke (MGS) [ $\mu\text{m}$ ]	34,8
Zählrahmen in Y-Achse (Y-ZR) [ $\mu\text{m}$ ]	60	Schnittperiodizität (p)	10
Fläche des Zählrahmens [ $\mu\text{m}^2$ ]	3600	Summe Zähleinheiten ( $\sum n$ )	672
Gitternetz Kästchen in X-Achse (X-GK) [ $\mu\text{m}$ ]	1000	Section sampling fraction (SSF)	$1 / 10 = 0,1$
Gitternetz Kästchen in Y-Achse (Y-GK) [ $\mu\text{m}$ ]	800	Area sampling fraction (ASF)	$3600 / (8 * 10^5) = 0,0045$
Fläche des Gitternetz Kästchens [ $\mu\text{m}^2$ ]	$8 * 10^5$	Thickness sampling fraction (TSF)	$28 / 34,8 = 0,8046$
Disektor Höhe (DH) [ $\mu\text{m}$ ]	28	<b>Gesamt- Neuronenzahl</b> ( <b>N<sub>total</sub></b> )	$1,856 * 10^6$ (= 1.855.994,6971)
Top guard und Bottom guard (TG, BG) [ $\mu\text{m}$ ]	1	Fehlerkoeffizient (CE = $1 / \sqrt{\sum n}$ )	0,04

### 2.4.2.3 Bestimmung des Gewebevolumens mit der „Cavalieri Probe“

#### Theoretischer Hintergrund dieser Methode:

Für die PC-gestützte Berechnung von Volumenschätzwerten einer bestimmten Zielregion im Kortex wurde die Methode „Cavalieri Probe“ der Stereologie-Software MBF Bioscience Stereo Investigator® (MicroBrightField, Inc., Williston, USA) angewendet. Sie stützt sich auf die mathematische Berechnung von Volumina mit Hilfe des Satzes von Cavalieri.

Nach Bonaventura Cavalieri (Turin, 1635) kann das Volumen eines Körpers durch die Summe der Flächen seiner Einzelschnitte berechnet werden. Hierfür werden zunächst systematisch und doch zufällig (systematically and randomly selected, SRS) ausgewählte Einzelschnitte durch eine Zielregion (hier Gewebeprobe) untersucht, um daraus anschließend das Volumen dieser Zielregion (**ROI**), also der betreffenden Rindenschicht, zu bestimmen.

In der hier eingesetzten Methode wird das sogenannte Punkt-Zähl-Prinzip angewandt. Ähnlich der Optical Fractionator-Methode aus 2.4.2.2 werden zunächst einzelne Zähleinheiten (Einzelflächen; s. Abb. 2.4-4: Gitternetz Kästchen aus weissen Kreuzen) manuell erfasst, mit deren Hilfe die Software bestimmte Flächenwerte ermittelt. Anschließend wird über die Summe der Einzelflächen (eines jeweiligen Schnittes) und deren konstanten Abstand zueinander das Volumen einer gesamten Zielregion berechnet.

Als Zähleinheiten dienen beim Punkt-Zähl-Prinzip der Cavalieri-Methode die Schnittpunkte eines Gitternetzes (weisse Kreuze), welche sich innerhalb der Grenzen einer zu untersuchenden Zielregion (ROI) befinden, die ihrerseits beim Verfahren "Optical Fractionator" zur Zellzählung schon farbig konturiert wurde (siehe Abb. 2.4-4).

Um den Schätzwert dieser Methodik möglichst realitätsnah zu halten wird empfohlen, die „Maschenweite“ des Gitternetzes so zu wählen, dass von jedem einzelnen Gewebeschnitt mindestens 250 Zähleinheiten erfasst werden (Glaser et al. 2007). Eine mögliche Fehlerquelle bei der Cavalieri-Methode kann sich dabei durch ein als Überprojektion (overprojection) bezeichnetes Phänomen ergeben: so wird das Schätzvolumen der betreffenden Zielregion durch ungenaues Fokussieren (Z-Achse) und Fehler beim Abgrenzen (Tracing) eventuell zu hoch. Um diese Fehlerquelle zu eliminieren, sollten folgende Aspekte berücksichtigt werden: die zu untersuchende Region soll (a) in eine Vielzahl kleiner Felder zerlegt werden, (b) soll tendenziell ein



starkes Objektiv mit geringer Fokustiefe benutzt werden und (c) soll für die Untersuchung der Schnitte unter dem Mikroskop dessen Beleuchtung optimal eingestellt werden (sogenannte “Köhler-Beleuchtung”; Schmitz und Hof 2005; Glaser et al. 2007).

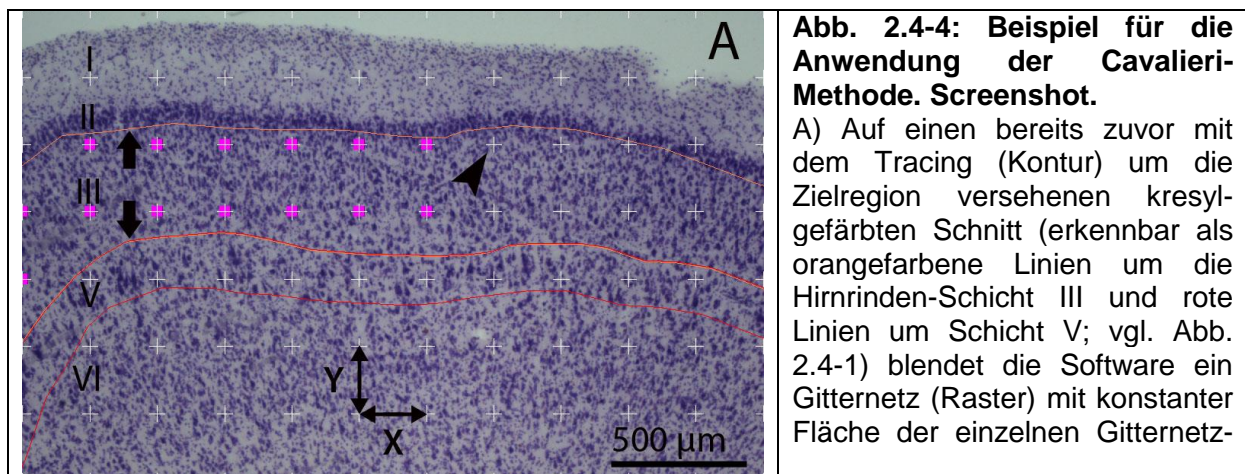
In der vorliegenden Arbeit wurde zur Vermeidung des Phänomens einer Überprojektion allen drei Aspekten Rechnung getragen.

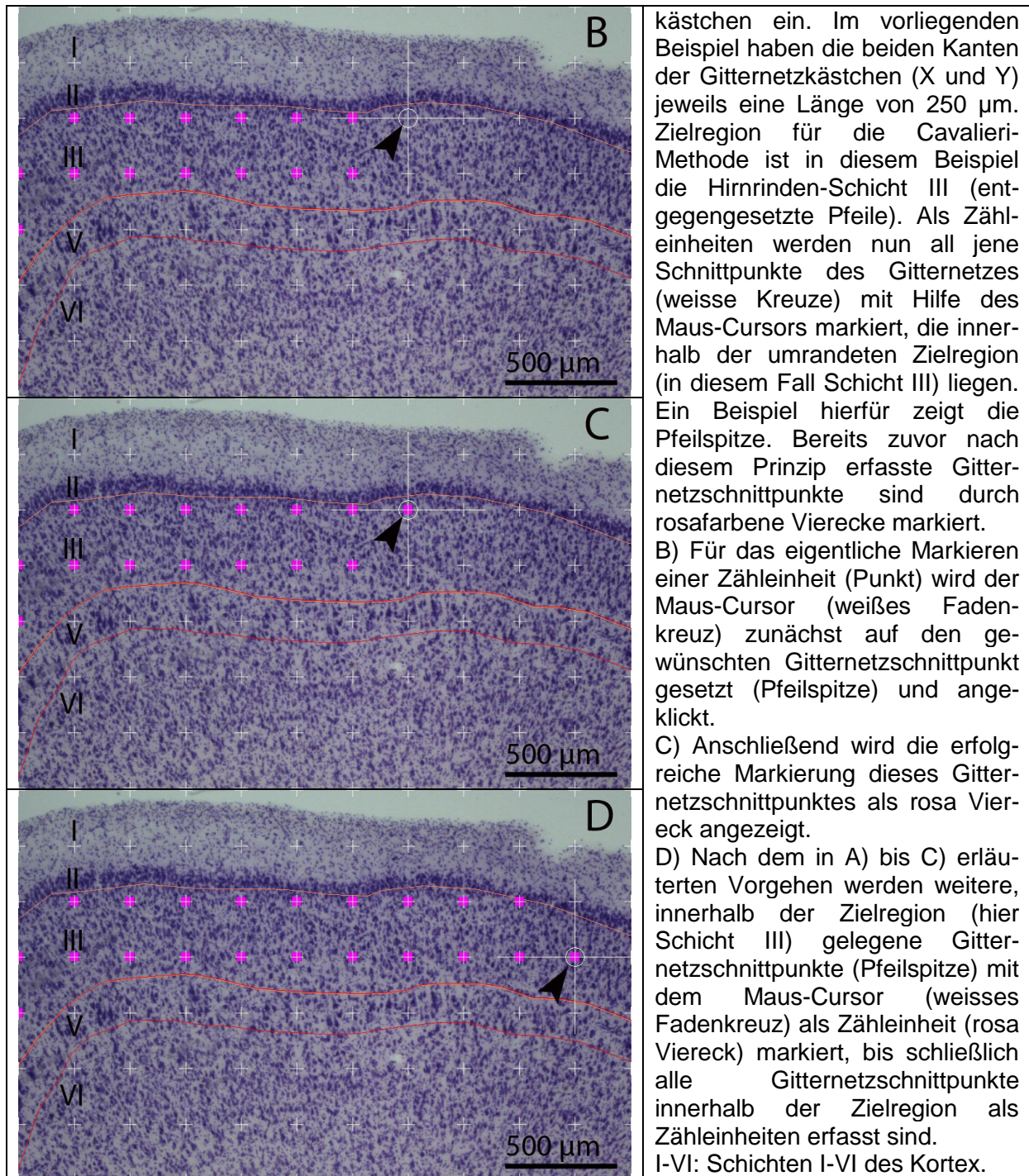
#### Zur praktischen Durchführung:

Zunächst wurde die Fläche der Zielregion (ROI; Rindenschicht) im jeweiligen Einzelschnitt ermittelt ( $F_{ROI}$ ). Dies erfolgte in der Software unter der Rubrik „Cavalieri Probe“.

Dabei wurde in das bei 25-facher Vergrößerung mit der Digitalkamera auf den Computerbildschirm übertragene Echtzeitbild zunächst ein vorgegebenes Gitternetz (SRS Grid; weisse Kreuze) in zufälliger Weise eingeblendet (siehe Abb. 2.4-4). Die Kontur um eine Zielregion im Gewebeschnitt (siehe Abb. 2.4-1) entsprach jener, die bereits für die Anwendung der Methode “Optical Fractionator” (Kap. 2.4.2.2) zur Bestimmung der reinen Neuronenzahl in einer Zielregion zum Einsatz kam (vgl. auch Abb. 2.4-1 und 2.4-2).

Die folgende Abbildung 2.4-4 gibt einen Überblick zur Anwendung der Cavalieri-Methode am Beispiel des primär-motorischen Kortex beim Großen Tümmler.





Nach der Markierung der einzelnen Zähl-einheiten (rosa Quadrate in Abb. 2.4-4) innerhalb des zu untersuchenden Gebiets berechnet die Software anschließend automatisch die Fläche dieser Zielregion ( $F_{ROI}$ ). Hierfür wurde die Anzahl der erfassten Zähl-einheiten im jeweiligen Gewebeschnitt ( $n_s$ ) mit der stets konstanten Fläche der Einzelkästchen im Gitternetz ( $k$ ) multipliziert:

$$F_{ROI} = n_s * k$$



Analog zur Berechnung der Fläche einer ROI im Einzelschnitt wurde anschließend auch die Summe der Fläche aller untersuchten Schnitte ( $\sum F_{ROI}$ ) berechnet. Sie ergibt sich aus dem Produkt der Summe aller erfassten Zähleinheiten ( $\sum n$ ) mit der stets konstanten Fläche eines Kästchens im Gitternetz ( $k$ ):

$$\sum F_{ROI} = \sum n * k$$

Aus der Summe der Flächen der Einzelschnitte ( $\sum F_{ROI}$ ) wurde dann das Volumen der Zielregion über die Gesamtzahl der Gewebeschnitte ( $V_{ROI}$ ) berechnet. Hierzu wurde die Summe der Einzelflächen ( $\sum F_{ROI}$ ) in den Schnitten mit der konstanten Distanz der Schnittoberkanten voneinander multipliziert. Dieser Abstand ( $L$ ) zwischen zwei bearbeiteten Schnitten ergab sich als Produkt der am Mikrotom eingestellten ursprünglichen Schnittdicke ( $d$ ) vor der histologischen Bearbeitung und dem numerischen Abstand der Schnitte zueinander ( $p$ ):

$$L = d * p$$

Die Volumenberechnung nach dieser Methode erfolgte also unabhängig von der Schrumpfung des Gewebes durch die histologische Bearbeitung (Glaser et al. 2007). Hier ein Beispiel: bei einer am Mikrotom eingestellten Schnittdicke  $d$  von 60  $\mu m$  und einem  $p$ -Wert von 10, wenn also jeder zehnte Schnitt untersucht wurde (Schnittperiodizität: 10), hätte  $L$  einen Wert von 600  $\mu m$ .

Der mit dieser Methode kalkulierte Volumenschätzwert der Zielregion ( $V_{ROI}$ ) ergab sich also insgesamt aus dem Produkt der Summe der jeweiligen Einzelfläche pro Schnitt ( $\sum F_{ROI}$ ) mit dem konstanten Längenabstand ( $L$ ) der Schnitte zueinander:

$$V_{ROI} = \sum F_{ROI} * L$$

Mit der weiteren Unterteilung des obigen Terms in

$$\sum F_{ROI} = \sum n * k \quad \text{und} \quad L = d * p$$

ergibt sich

$$V_{ROI} = \sum n * k * d * p$$

In Worten: beim Ersetzen der Summe an Einzelflächen ( $\sum F_{ROI}$ ) durch das Produkt der Summe aller erfassten Zähleinheiten ( $\sum n$ ) mit der stets konstanten Fläche eines Kästchens im Gitternetz ( $k$ ),

also  $\sum F_{ROI} = \sum n * k$ ,

und beim Ersetzen des konstanten Längenabstandes der Schnittoberkanten voneinander ( $L$ ) durch das Produkt der am Mikrotom eingestellten Schnittdicke der

Gewebeproben vor der Prozessierung (**d**) und dem numerischen Abstand der Schnitte zueinander (**p**),

also  $L = d * p$ ,

ergibt sich insgesamt:

$$V_{ROI} = \sum n * k * d * p \quad (\text{Glaser et al. 2007})$$

Die folgende Tabelle zeigt am Beispiel des großen Tümmlers die stereologische Berechnung des Volumens in einer Zielregion (Schicht III, primärer Motorkortex) mit Hilfe der Cavalieri-Methode.

**Tab. 2.4-2** Beispiel der Parameter zur Berechnung des Volumens

<u>Im Vorfeld festgelegte Parameter</u>	<u>Wert</u>	<u>Während der Zählung ermittelte Parameter</u>	<u>Wert</u>
Fläche eines Gitternetzkästchens (k) [ $\mu\text{m}^2$ ]	62500	Summe der Zähleinheiten ( $\sum n$ )	2447
Schnittdicke vor der Prozessierung (d) [ $\mu\text{m}$ ]	60	Schätz-Volumen der Zielregion ( $V_{ROI}$ ) [ $\mu\text{m}^3$ ]	$91762,5 * 10^6$
Periodizität/ numerischer Abstand der Schnitte (p)	10	Fehlerkoeffizient ( $CE = 1 / \sqrt{\sum n}$ )	0,02

Zur besseren Nachvollziehbarkeit werden für beide stereologischen Methoden im Ergebnisteil (Optical fractionator und Cavalieri Probe) hier die jeweils verwendeten Parameter tabellarisch aufgelistet (s. Tab. 3.6-1 bis 3.6-6).

Abschließend liefert Tabelle 2.4-3 eine Übersicht zu den in Kapitel 2.4.2 im Zusammenhang mit der Stereologie verwendeten Abkürzungen:

**Tab. 2.4-3** Übersicht der Abkürzungen aus Kap. 2.4.2 „Design-basierte Stereologie“

<u>Begriff</u>	<u>Abkürzung</u>
Anfangsschnitt einer Untersuchungsreihe	<b>a</b>
Am Mikrotom eingestellte Schnittdicke	<b>d</b>
Area sampling fraction	<b>ASF</b>
Bottom Guard	<b>BG</b>
Disektor Höhe	<b>DH</b>
Distanz zwischen den untersuchten Einzelschnitten	<b>L</b>
Fehlerkoeffizient	<b>CE</b>
Fläche einer Zielregion (region of interest)	<b>F<sub>ROI</sub></b>
Fläche eines Gitternetzkästchens	<b>k</b>

Gesamt-Neuronenzahl	<b>N<sub>total</sub></b>
Gitternetzkästchen	<b>GK</b>
Maß des Gitternetzkästchens in der X-Achse	<b>X-GK</b>
Maß des Gitternetzkästchens in der Y-Achse	<b>Y-GK</b>
Maß des Zählrahmens in der X-Achse	<b>X-ZR</b>
Maß des Zählrahmens in der Y-Achse	<b>Y-ZR</b>
Mittlere gemessene Schnittdicke	<b>MGS</b>
Referenzpunkt	<b>RP</b>
Schnittperiodizität	<b>p</b>
Section sampling fraction	<b>SSF</b>
Summe der Flächen aller Zielregionen	<b><math>\Sigma F_{ROI}</math></b>
Summe der Zähleinheiten innerhalb eines Schnittes	<b>n<sub>s</sub></b>
Summe der Zähleinheiten über alle Schnitte hinweg	<b><math>\Sigma n</math></b>
Thickness sampling fraction	<b>TSF</b>
Top Guard	<b>TG</b>
Volumen der Zielregion über alle Schnitte hinweg	<b>V<sub>ROI</sub></b>
Zähleinheit	<b>n</b>
Zählrahmen	<b>ZR</b>
Zählstelle (site)	<b>ZS</b>
Zielregion (region of interest)	<b>ROI</b>

## 2.5 Technische Ausrüstung

Zur Durchführung der vorliegenden Untersuchungen wurde eine Vielzahl technischer Hilfsmittel verwendet. Der nachfolgende Abschnitt liefert eine Übersicht hierzu.

### 2.5.1 Mikroskope und Kameras

Für die histologische Auswertung der Kortexprouben wurden folgende Geräte benutzt.

Mikroskope: BH2, Olympus, Hamburg

Axiophot, Zeiss, Jena

Objektive: Plan-NEOFLUAR, Zeiss, Jena ( 2,5-fach)

Plan-NEOFLUAR, Zeiss, Jena ( 5,0-fach)

Plan-APOCHROMAT, Zeiss, Jena (10,0-fach)

Plan-NEOFLUAR, Zeiss, Jena (20,0-fach)

Plan-NEOFLUAR, Zeiss, Jena (40,0-fach)

Digitalkamera: Microfire™, Optronics, Goleta, USA (Auflösung: 1600 \* 1200 Pixel)

### 2.5.2 Bildbearbeitungs-Software

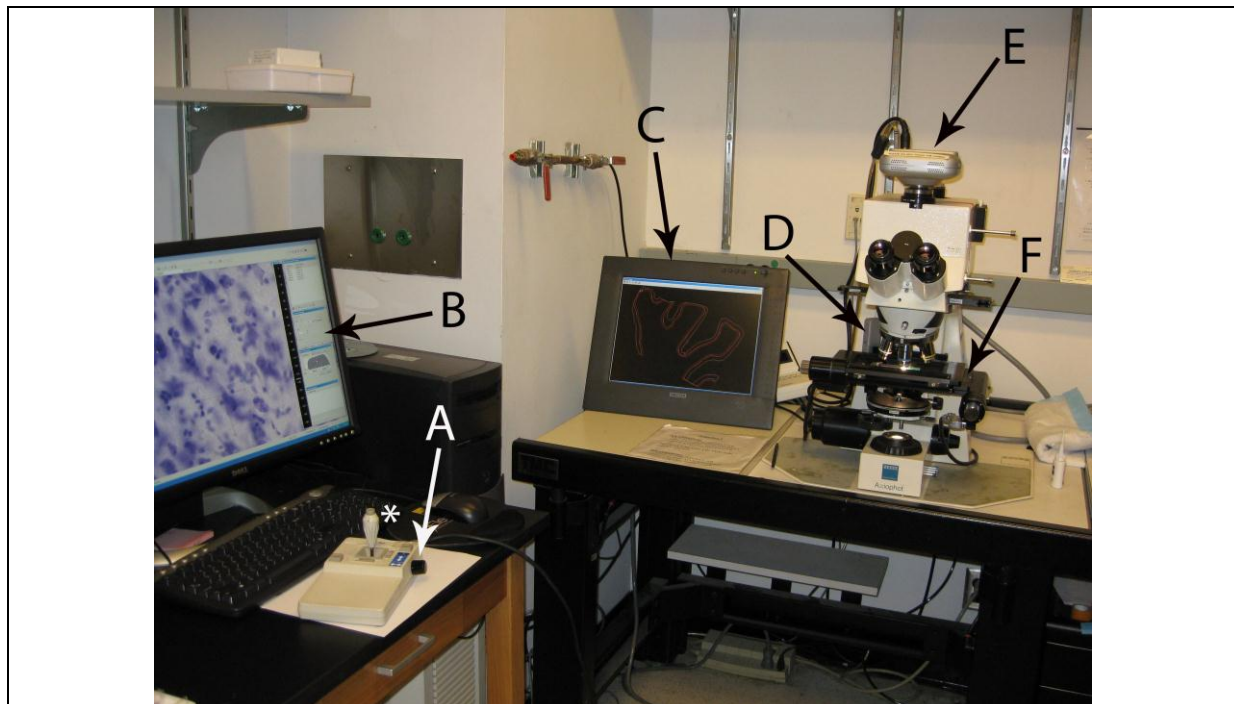
Für die quantitativ-morphologische Auswertung der Hirnrindenproben wurden die mit der Digitalkamera aufgenommen Fotos mit folgendem Programm weiterbearbeitet:

Adobe® Photoshop® Version CS2 (Adobe Systems Incorporated, San José, USA).

### 2.5.3 Stereologie-Software

Im Rahmen der stereologischen Analyse der Kortexprouben wurde folgende Software verwendet: MBF Bioscience Stereo Investigator® Version 8.24 (MicroBrightField, Inc., Williston, USA).

Einen Eindruck vom Mikroskop-Arbeitsplatz samt der Apparatur, an dem die stereologischen Untersuchungen durchgeführt wurden zeigt Abbildung 2.5-1.



**Abb. 2.5-1: Die für die stereologische Analyse benutzte Apparatur im Überblick.**

Gezeigt wird ein Ausschnitt des Stereologie-Arbeitsplatzes mit dem 3-Ebenen Joystick (Sternchen) samt Z-Achsen-Rädchen (schwarzes Rädchen A am rechten Joystick-Rand), dem Bildschirm samt Tastatur für die software-gestützte Erfassung der Zählheiten (B), dem Übersichtsmonitor zur Orientierung an der Kontur im histologischen Schnitt (C), dem Z-Achsen-Sensor am Mikroskop (D), der Digitalkamera (E) sowie der motorisierten 2-Ebenen-Objektträger-Plattform (F).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vergleich der primären Rindenfelder im Nissl-Zellbild

In diesem Unterkapitel geht es um die Herausarbeitung eindeutiger und allgemein gültiger Spezifika der folgenden vier untersuchten primären Rindenfelder bei verschiedenen Säugetieren im Nissl-Zellbild:

- das motorische Primärfeld (M1),
- das somatosensible Primärfeld (S1),
- das auditorische Primärfeld (A1) und
- das visuelle Primärfeld (V1).

Dabei werden vorerst für drei Großgruppen von Säugetieren insgesamt drei ausgewählte Spezies exemplarisch miteinander verglichen und analysiert:

- für die Wäلتiere bzw. die Zahnwale der Große Tümmler (*Tursiops truncatus*),
- für die Huftiere das Hausschwein (*Sus scrofa f. domestica*)
- und für die Primaten der Mensch (*Homo sapiens*).

Ein solcher konsequenter Vergleich der verschiedenen Kortizes bei verschiedenen Säugergruppen liegt in der Literatur bislang noch nicht vor (s. Kap. 1.2 und 4.1).

Die verwendeten Kortexproben stammen von Gehirnen aus mehreren Institutssammlungen (vgl. hierzu Kap. 2.2 sowie Tab. 2.2-3): Großer Tümmler (Prof. Cozzi, Universität Padova, Italien), Schwein (Prof. Oelschläger, Dr. Senckenbergische Anatomie, Universität Frankfurt am Main) sowie Mensch (Prof. Hof, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA).

Mit Hilfe der Nissl-Färbung soll hier die Zytoarchitektonik des Kortex bei diesen Säugetieren veranschaulicht werden. Charakteristika wie Rindenaufbau, Schichtengliederung und Zellmorphologie stehen dabei im Zentrum. Die nachfolgenden dreiteiligen Abbildungen eines jeden Areals sind dabei jeweils so angeordnet, dass der linke Teil vom Großen Tümmler, der mittlere vom Hausschwein und der rechte Teil vom Menschen stammt.

Zur Terminologie: In der neurobiologischen Literatur wird bei der Nissl- Morphologie des Kortex in den einzelnen Schichten oft nicht von Somata gesprochen, was korrekt wäre, sondern von Neuronen. Allerdings sind gerade im Fall der Körnerzellen (s.u.), welche im Gegensatz zu Pyramidenzellen nur lokal projizieren, die Zellfortsätze meist sehr kurz und auf die Nachbarschaft des Perikaryons beschränkt, so dass zumindest hier in der betreffenden Schicht von Neuronen gesprochen werden kann.

### **3.1.1 Motorisches Areal (M1, Brodmann-Areal 4)**

Hinsichtlich seiner Zytoarchitektonik zeigt das motorische Primärfeld (M1) eine Reihe von Besonderheiten, die bei den einzelnen Spezies unterschiedlich deutlich in Erscheinung treten. Auffallend ist bei diesem Areal jedoch speziesübergreifend das Fehlen der inneren Körnerschicht (Lamina granularis interna, Schicht IV). Diese Hirnrinde wird deshalb auch als agranulär oder pyramidisiert bezeichnet (siehe Kap. 1.5). Außerdem existiert eine prominente Schicht V, die mit großen Pyramidenzellen bestückt ist.

Bei den jeweiligen Spezies ergeben sich im Nissl-Zellbild die folgenden Details (vgl. Abb. 3.1-1):

#### **Großer Tümmler (Abb. 3.1-1, links)**

Das Areal umfaßt eine relativ dicke Schicht I (Lamina molecularis); eine zelldichte und daher auffällige, aber dünne Schicht II (L. granularis externa); eine homogene und relativ dicke Schicht III (L. pyramidalis externa), deren Pyramidenzellen in Richtung Album an Größe zunehmen und welche meist in zwei sublayer (IIIa, IIIb) unterteilt ist; Schicht IV (L. granularis interna) fehlt, Schicht V (L. pyramidalis interna) ist mit großen Pyramidenzellen bestückt und Schicht VI (L. multiformis) ist ausgedehnt. Insgesamt gesehen scheint das Zellbild pyramidisiert, d.h. Pyramidenzellen bilden den Hauptanteil der Neuronen, während kleine körnerartige Zellen unterhalb von Schicht II und oberhalb von Schicht VI (bei stärkerer Vergrößerung) kaum erkennbar sind. Lamina VI enthält neben Körnerzellen auch kleinere Pyramidenzellen.

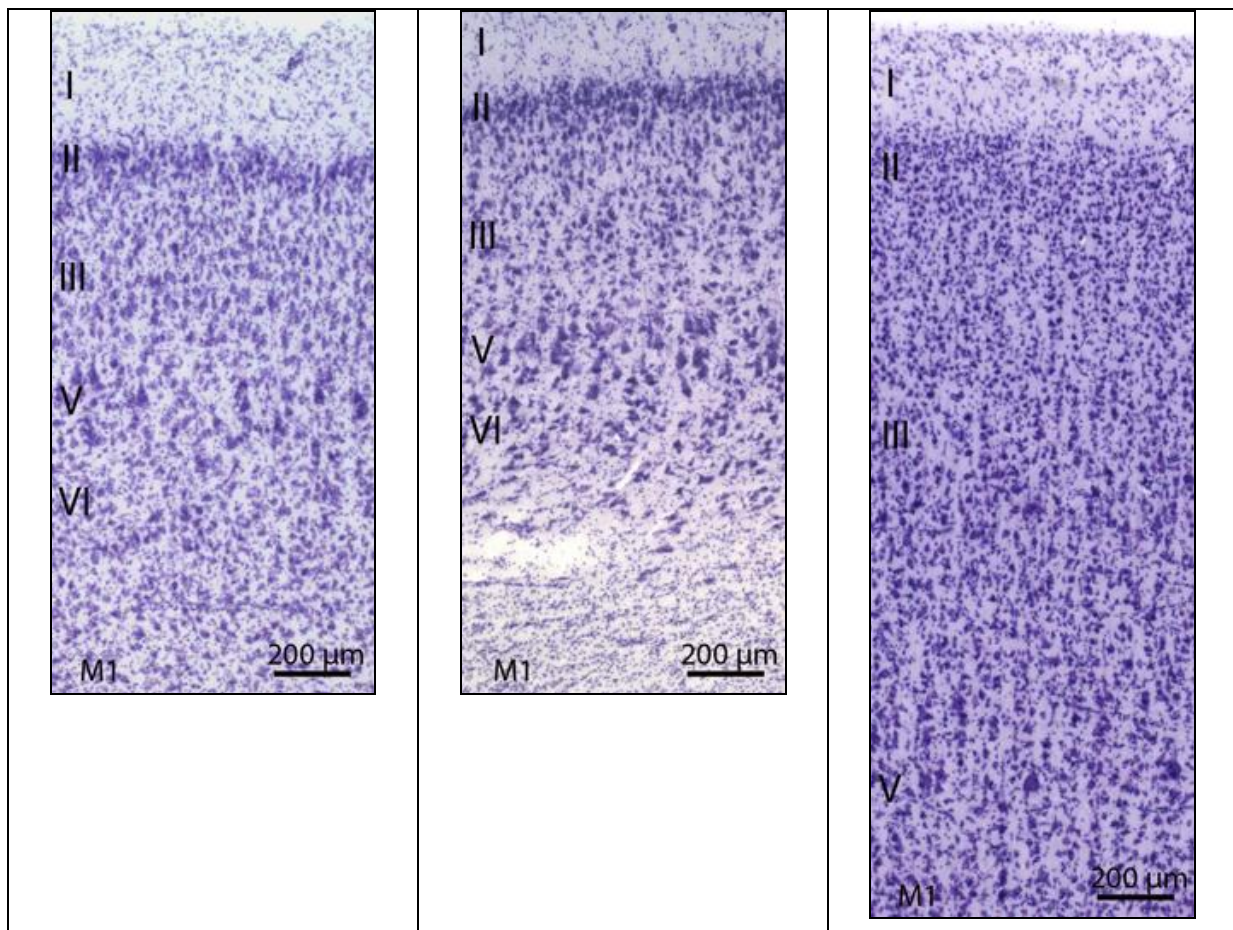
#### **Hausschwein (Abb. 3.1-1, Mitte):**

Im Vergleich zum Großen Tümmler stellt sich das Nissl-Zellbild hier sehr ähnlich dar. Typisch sind auch hier das Fehlen einer IV. Schicht (agranulärer Kortex) und die prominenten Pyramidenzellen in Schicht V. Eine akzentuierte Schicht II und eine Schicht III, in deren Tiefe die Pyramidenzellen an Größe zunehmen, sind ebenfalls erkennbar. Den Abschluss zur weißen Substanz hin bildet Schicht VI, die kleine Pyramidenzellen und Körnerzellen enthält.

#### **Mensch (Abb. 3.1-1, rechts):**

Das motorische Primärfeld des Menschen (Area 4 oder gigantopyramidalis nach Brodmann, vgl. Abb. 1.5-2) zeigt spezifische Besonderheiten: die Rinde ist im Vergleich zum Großen Tümmler und zum Schwein insgesamt deutlich dicker (infolge

fotografischer Limitationen bei gleicher Objektivstärke am Mikroskop wurde Schicht VI hier weggelassen; die Dicke von M1 insgesamt kann beim Menschen Werte von 3- 5 mm erreichen (Leonhardt und Lange 1987; Rager et al. 2004). Die Rinde erscheint ebenfalls pyramidisiert und zeigt im Vergleich zum Delphin und Schwein extrem viele kleine Zellen. Schicht II ist weder prominent noch verdichtet. Doch sind auch hier die allgemein-charakteristischen Merkmale offensichtlich: Vergrößerung der Pyramidenzellen mit zunehmender Tiefe in Schicht III, das Fehlen von Schicht IV (agranulärer Rindentyp), große Pyramidenzellen in Schicht V. Die größten Pyramidenzellen in dieser Schicht werden auch als Betz-Riesenpyramidenzellen bezeichnet.



**Abb. 3.1-1: Das motorische Primärfeld (M1) im Vergleich.**

Beim Großen Tümmler (links), beim Schwein (Mitte) und beim Menschen (rechts) sind in M1 vor allem das Fehlen der Schicht IV und das Vorhandensein einiger großer Pyramidenzellen in Schicht V charakteristisch. Die großen Pyramidenzellen in Schicht V des Menschen werden auch Betz-Riesenpyramidenzellen genannt. Beachte die unterschiedlich dicke Rinde beim Mensch im Vergleich zum Großen Tümmler und zum Schwein. Schicht VI in diesem Rindenareal konnte beim Menschen aus fotografischen Gründen nicht berücksichtigt werden.

I-VI: Kortex-Schichten I bis VI.

### **3.1.2 Somatosensibles Areal (S1, Brodmann-Areal 3)**

Im Vergleich zum primär-motorischen Areal (M1) zeigt das primär-somatosensible Rindenfeld (S1) mehr spezies-spezifische Merkmale: Die für S1 typische Ausprägung als sogenannter Koniokortex (griech. „konion“: Sand, Staub; Gemoll 1965, Kahle 1975, Langenscheidts Taschenwörterbuch 1977), mit einer inneren Körnerschicht (Schicht IV), vollgepackt mit kleinen, runden Neuronen findet sich lediglich bei den beiden Landsäugetieren Schwein und Mensch. Beim Wassersäugetier (Großer Tümmler) hingegen fehlt dieses Merkmal. Im Detail sieht die Rinde bei allen drei Spezies wie folgt aus (vgl. Abb. 3.1-2).

#### **Großer Tümmler:**

Beim Delphin fallen in diesem Areal neben dem Fehlen einer Schicht IV noch eine dicke Schicht I, die akzentuierte und zelldichte Schicht II, eine relativ dicke Schicht III und die eher unscheinbare Schicht V auf. Die Anzahl und Größe der Pyramidenzellen in Schicht V sind moderat, doch sind sie deutlich stärker ausgeprägt als bei Schwein und Mensch. Die multiforme Schicht VI enthält neben kleineren Pyramidenzellen auch rundliche Somata. Insgesamt jedoch dominiert in diesem Delphin-Kortex, ähnlich dem motorischen Areal M1, der pyramidenartige Zelltyp.

#### **Schwein:**

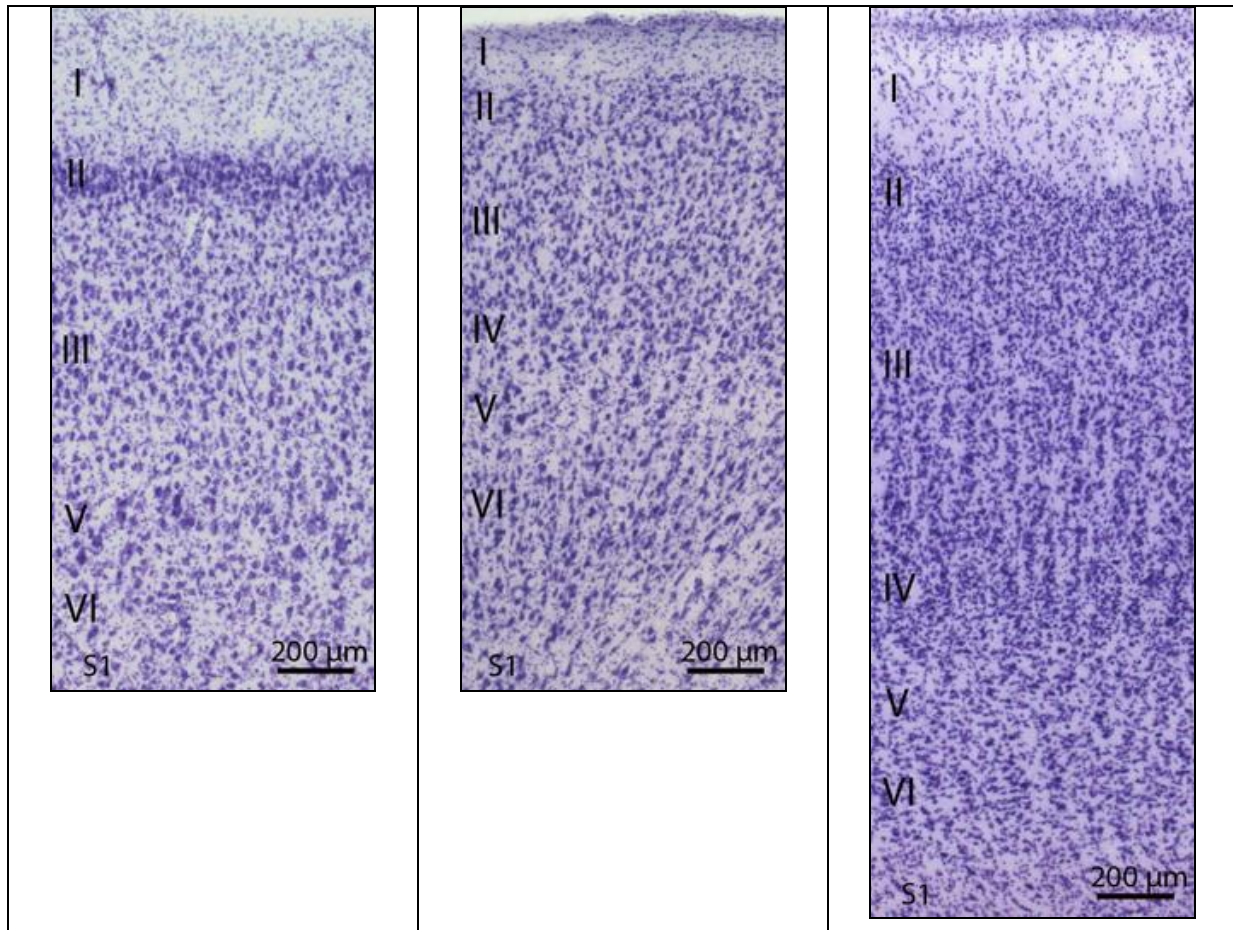
Dieses Rindenareal zeigt beim Schwein das typische Bild eines Koniokortex mit einer mehr oder minder deutlich erkennbaren inneren Körnerschicht (Schicht IV). Schicht I ist relativ schmal und Schicht II wenig betont. Die äußere Pyramidenschicht (Schicht III) und die innere Pyramidenschicht (Schicht V) sind ebenfalls erkennbar. Allerdings enthält die zellärmere Schicht V in diesem Areal keine übergroßen Pyramidenzellen. Schicht VI zeigt ein heterogenes Bild mit verschiedenen Zellformen.

#### **Mensch:**

Im somatosensorischen Primärfeld des Menschen scheint die Rinde im Vergleich mit der Situation bei Delphin und Schwein weniger stark verbreitert als beim motorischen Kortex. Im Nissl-Bild sind die Neuronen insgesamt kleinzellig (parvozellulär) und dicht gepackt. Auffälliges Merkmal dieser Region ist wie beim Schwein das Vorhandensein einer inneren Körnerschicht (Schicht IV). Sie ist allerdings markanter, besonders reich an sehr kleinen, runden (granulären) Neuronen und sehr zelldicht. Schicht I ist gut entwickelt, Schicht II ist gut erkennbar, jedoch nicht akzentuiert. In Schicht III nimmt die Größe der Pyramidenzellen in Richtung auf das Album zu. Letztere



scheinen größere Kaliber aufzuweisen als die Pyramidenzellen in Schicht V, welche eher unscheinbar wirkt und frei ist von allzu großen Somata. Schicht VI bietet ein buntes Zellbild. Insgesamt also entspricht dieser Kortex einem typischen Koniokortex.



**Abb. 3.1-2: Das somatosensorische Primärfeld (S1) im Vergleich.**

Delphin (links), Schwein (Mitte) und Mensch (rechts) bieten ein unterschiedliches Nissl-Bild: Schwein und Mensch zeigen die typische Konfiguration eines Koniokortex, bei dem die innere Körnerschicht (Schicht IV) deutlich ausgeprägt ist. Beim Delphin-Kortex hingegen fehlt dieses Merkmal. Hier dominiert der pyramidenartige Zelltyp (mit einem Maximum in Schicht V). Die Granularität ist wesentlich weniger ausgeprägt als bei den beiden Landsäugetieren.

I-VI: Hirnrindenschichten I bis VI.

### 3.1.3 Auditorisches Areal (A1, Brodmann-Areal 41)

Das auditorische Primärfeld der Großhirnrinde (A1) stellt sich bei den drei Säugern ebenfalls unterschiedlich dar. Schwein und Mensch bieten- vergleichbar der primär somatosensiblen Rinde (S1) beider Spezies- auch hier das typische Bild eines Koniokortex mit deutlich erkennbarer Schicht IV. Sie wird gebildet von einer Vielzahl

kleiner, runder (granulärer) Neuronen. Dem Großen Tümmler dagegen fehlt dieses Merkmal. Sein Kortex zeigt ein pyramidisiertes, agranuläres Zellbild ohne innere Körnerzellschicht (Schicht IV). Schicht V beherbergt beim Tümmler im Vergleich zu Mensch und Schwein maximal große Pyramidenzellen. Darüber hinaus zeigt speziell der primär-auditorische Kortex des Menschen das Phänomen der „Regenschauerformation“ (raindrop pattern; vgl. Seldon 1985; Rager et al. 2004). Die vielen kleinen Zellen sind hierbei übereinander in schmalen, vertikalen Säulen angeordnet und erzeugen so das Bild von an einem Fenster entlang laufenden Regentropfen. Beim Schwein ist dieses Muster ebenfalls vorhanden, wenn auch in abgeschwächter Form, beim Delphin dagegen ist es undeutlich vorhanden.

Im Einzelnen fallen bei den jeweiligen Kortizes folgende Charakteristika auf (vgl. Abb. 3.1-3):

### **Großer Tümmler:**

Der auditorische Kortex zeigt hier mehrere Spezifika: eine breite Schicht I, eine zelldichte und auffällige, aber schmale Schicht II, eine breite Schicht III mit Größenzunahme der Pyramidenzellen zum Album hin. Schicht V ist deutlich erkennbar und umfasst sehr große, eingestreute Pyramidenzellen, die - im Vergleich zu Schwein und Mensch- hier wesentlich stärker imponieren. Schicht VI wirkt multiform und zusammen mit den tiefen Anteilen von Schicht III und dem Großteil von Schicht V in der Vertikalen ansatzweise säulenartig organisiert.

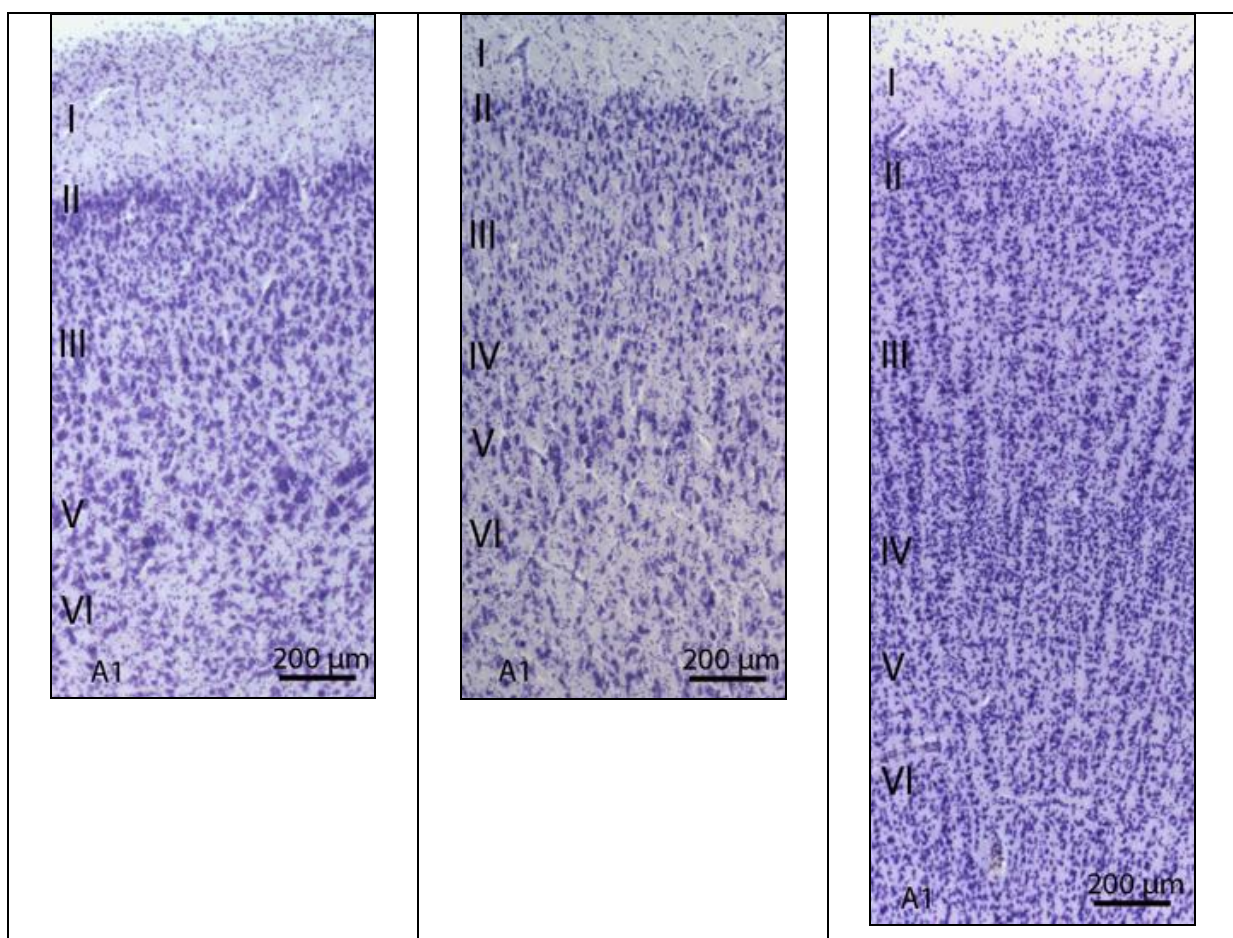
### **Schwein:**

Der Kortex dieses Tieres zeigt im wesentlichen das bereits oben erwähnte Bild eines Koniokortex. Zwischen den beiden Pyramidenzellschichten III und V liegt eingestreut eine granuläre Schicht IV, die eine Vielzahl an kleinen Zellen umfasst. Weitere Charakteristika dieses Areals sind eine mäßig akzentuierte Schicht II (weniger offensichtlich als beim Großen Tümmler), eine gut erkennbare, wenn auch im Vergleich zum Delphin mit mittelgroßen Pyramidenzellen ausgestattete Schicht V und eine heterogene Schicht VI. Das Gesamtbild dieses Kortex scheint ähnlich wie beim Menschen, aber weniger deutlich, vertikal in feinen Säulen angeordnet (Regenschauerformation).

### **Mensch:**

Auffällige Merkmale des primär-auditorischen Kortex sind hier im Nissl-Zellbild eine breite und sehr zellreiche Schicht IV und eine über die gesamte Kortexdicke

ausgedehnte Regenschauerkonfiguration. Hierbei sind die Somata durch alle Schichten hindurch in vertikalen Säulen angeordnet. Darüber hinaus ist das schichtübergreifende Zellbild im Vergleich zum Tümmler und zum Schwein feiner, dichter gepackt und sehr kleinzellig (parvozellulär). Auch ist der Kortex insgesamt deutlich dicker. In Schicht III tritt albumwärts eine Vergrößerung der Pyramidenzellen auf, hingegen bietet Schicht V keine allzu großen Zellen dieses Typs. Schicht VI wirkt weitläufig und reicht diffus weit ins Mark hinein. Insgesamt also zeigt sich das typische Bild eines Koniokortex mit dem spezifisch-auditorischen Merkmal der sogenannten Regenschauerformation (siehe oben).



**Abb. 3.1-3: Das auditorische Primärfeld (A1) im Vergleich.**

Der Nissl-Zellbild dieses Areals zeigt beim Großen Tümmler (links), beim Schwein (Mitte) und beim Menschen (rechts) ein unterschiedliches Bild. Während beim Delphin ein agranulärer (Fehlen von Schicht IV) und allgemein pyramidierter Kortex mit maximal großen Pyramidenzellen in Schicht V vorliegt, zeigen das Schwein und vor allem der Mensch das typische Bild eines auditorischen Koniokortex: Schicht IV ist deutlich erkennbar und die Neuronen des Kortex wirken wie über seine gesamte Dicke in vertikaler Richtung perlschnurartig aufgereiht (Regenschauerformation).

I-VI: Hirnrindenschichten I bis VI.

### **3.1.4 Visuelles Areal (V1, Brodmann-Areal 17)**

Das visuelle Primärfeld der Großhirnrinde (V1) zeigt bei den drei Spezies - wie auch schon die Areale M1, S1 und A1- zwar eine unterschiedliche Differenzierung, allerdings auf der Basis einer generell höheren Zelldichte und Homogenität, vor allem aber bei den terrestrischen Formen (Schwein, Mensch). Während bei diesen beiden Spezies hier jedoch eher ein horizontales Muster auffällt (im Gegensatz zum auditorischen Kortex mit seinem vertikalen "raindrop pattern"), zeigt V1 beim Delphin eine minimale Gliederung. Insgesamt entspricht das histologische Bild bei den terrestrischen Formen also einem typischen Koniokortex mit deutlich angelegter innerer Körnerzellschicht (Schicht IV). Beim Menschen ist Schicht IV sogar in mehrere Sublaminae unterteilt (IVa, IVb und IVc), wobei die Sublamina IVc ihrerseits nochmals unterteilt werden kann (IVc $\alpha$ , IVc $\beta$ : s. Tab. 1.5-1). Das Nissl-Zellbild von V1 beim Großen Tümmler hingegen entspricht eher einem agranulären, von Pyramidenzellen dominierten Kortex (Pyramidisierung), der sich in Schichtengliederung und Zellbestand kaum von den Arealen M1, S1 und A1 dieser Spezies unterscheidet. Die histologischen Details der jeweiligen Kortex-Areale werden im Folgenden genauer beleuchtet (vgl. Abb. 3.1-4).

#### **Großer Tümmler:**

Einer relativ breiten Schicht I schließt sich eine mäßig akzentuierte Schicht II an. Schicht III wirkt breit und verhältnismäßig zell dicht; mit zunehmender Schichttiefe vergrößern sich die Pyramidenzellen. Schicht IV ist nicht erkennbar, und auch generell zeigt dieser Kortex keine Granularisierung. Schicht V weist ein Maximum an Pyramidenzellgröße auf, auch wenn sehr große Zellen hier nur vereinzelt auftreten. Trotzdem sind diese Zellen sehr viel größer als alles, was die beiden terrestrischen Spezies bei V1 aufbieten können. Im Vergleich mit Schwein und Mensch wirkt diese Schicht dadurch also relativ prominent. Schicht VI erscheint heterogen, enthält relativ kleine Zellformen.

Insgesamt also zeigt der visuelle Kortex des Großen Tümmlers- wie auch schon bei M1, S1 und A1- keine Merkmale eines Koniokortex, sondern wirkt agranulär und pyramidisiert.

#### **Schwein:**

V1 zeigt beim Schwein die typischen Merkmale eines Koniokortex: Schicht IV ist deutlich ausgeprägt und allgemein wirkt der Kortex von vielen kleinen Neuronen

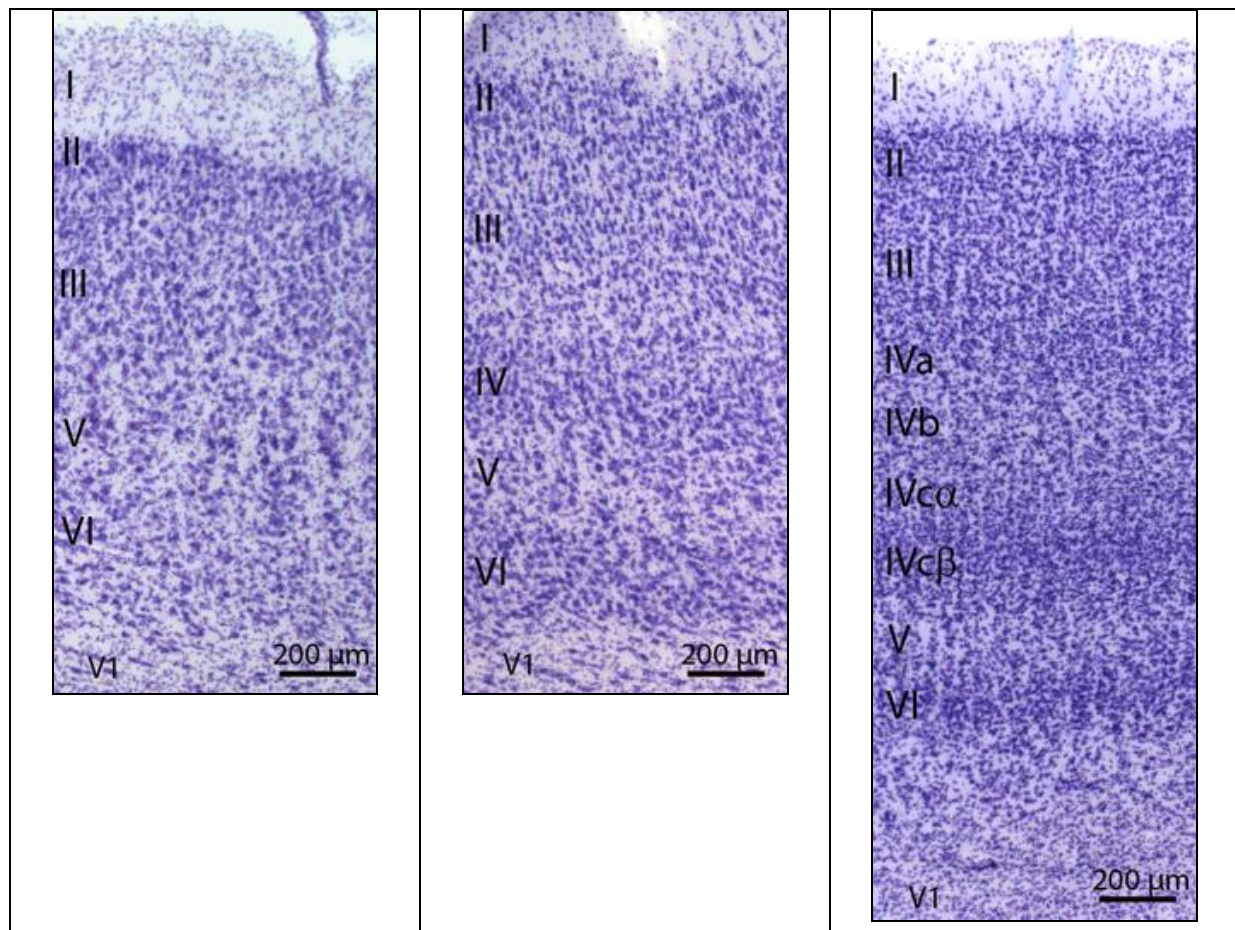
durchsetzt. Schicht I wirkt eher schmal, Schicht II ist wenig betont und die äußere Pyramidenschicht (Schicht III) recht kleinzellig. Vereinzelt treten in der Tiefe von Schicht III etwas größere Pyramiden auf (in Abb. 3.1- 4 nicht dargestellt). Schicht IV ist dagegen (im Vergleich gesehen) kaum parvozellulär. Schicht V wirkt relativ unscheinbar, ist locker gepackt und ihre Zellen sind nicht übermäßig groß. Schicht VI ist wie Schicht IV zell dicht und gut abgrenzbar.

In der Summe zeigt sich hier also das Bild eines zell dichten Koniokortex, bei dem eine deutliche Schichtengliederung (Laminierung) angelegt ist.

### **Mensch:**

Das visuelle Primärfeld des Menschen zeigt eine Reihe sehr charakteristischer Merkmale: Diese Rinde ist im Vergleich zu den anderen Arealen des Menschen mit 1,5 bis 2,0 mm meist relativ schmal (Rager et al. 2004), doch außerordentlich klar geschichtet. Einer dünnen Schicht I schließen sich zwei relativ schmale Schichten II und III an, welche kontinuierlich ineinander übergehen. Schicht IV dagegen ist maximal breit und zellreich und in die Unterschichten IVa, IVb und IVc (IVc $\alpha$  und IVc $\beta$ ) aufgegliedert. IVa und IVc $\beta$  sind besonders zellreich, wobei in Sublamina IVc $\beta$  Neuronen eines besonderen Zell-Typus auftreten: die wegen ihres Dendritenbaumes so genannten „bedornten Sternzellen“ (Rager et al. 2004). Schicht V wirkt eher schmal und zellarm. Schicht VI ist deutlich erkennbar und insbesondere in ihrer oberen Zone zellreich. Insgesamt ist der visuelle Kortex des Menschen also geprägt von einer Reduktion der Pyramidenschichten III und V und einer sehr starken Betonung der Körnerzellschichten, insbesondere in Schicht IV. So zeigt dieser Koniokortex durch seine Untergliederung der Lamina IV ein Maximum an Schichtenkomplexität (vgl. Tab. 1.5-1).





**Abb. 3.1-4: Das visuelle Primärfeld (V1) im Vergleich.**

Großer Tümmler (links), Schwein (Mitte) und Mensch (rechts) zeigen in diesem Areal deutliche zytoarchitektonische Unterschiede. Das Nissl-Bild des Delphin-Kortex wirkt grob gegliedert und agranulär. Das Koniokortex-Merkmal der inneren Körnerzellschicht (Schicht IV) fehlt. Die Pyramidenzellschichten III und V dominieren das Bild. Im Gegensatz dazu sieht man beim Schwein und dem Menschen jeweils eine deutliche Schicht IV. Sie ist gekennzeichnet durch Massen von kleinen bis extrem kleinen körnerartigen Zellen (Granularisierung). Bei beiden Spezies wirken die Kortizes insgesamt zellreicher und delikater geschichtet als beim Delphin. Beachte die mehrfache Unterteilung der inneren Körnerzellschicht des Menschen. Dieser schichtenreiche und komplexe Aufbau der Rinde hebt sich deutlich von der Situation beim Schwein und Delphin ab.

I-VI: Kortexschichten I bis VI.

### 3.2 Die primären Rindenfelder verschiedener Zahnwale im Nissl-Zellbild

Nach dem einführenden, ordnungsübergreifenden Rindenvergleich beim Großen Tümmler, Schwein und Mensch geht es im folgenden Teil nun um die Dokumentation und Besprechung kortikaler Besonderheiten innerhalb einzelner Zahnwal-Spezies bzw. -Individuen. Untersucht werden hierfür folgende Spezies: La-Plata-Delphin (ein Exemplar), Amazonasdelphin (zwei Exemplare), Glattschweinswal (ein Exemplar), der Gemeine Delphin (zwei Exemplare) und der Große Tümmler (zwei Exemplare). Die Exemplare entstammen den Sammlungen der Dr. Senckenbergischen Anatomie

und des Naturmuseums und Forschungsinstituts Senckenberg in Frankfurt am Main (vgl. Tabelle 2.2-1) und sind analog zur aufsteigenden Primatenreihe nach Stephan (Stephan und Andy 1964; Stephan 1967; Stephan und Andy 1969; Stephan et al. 1981) nach zunehmendem Hirngewicht angeordnet ("aufsteigende Delphin-Reihe", vgl. Tab. 2.2-2, s. Poth et al. 2005).

Für den Vergleich werden die Nissl-Zellbilder der vier primären Rindenfelder (M1, S1, A1, V1) jeweils einer Spezies einander gegenübergestellt. Die Abbildungen zu den einzelnen Kortizes sind dabei stets von links nach rechts in der Reihenfolge M1, S1, A1 und V1 angeordnet.

### 3.2.1 La-Plata-Delphin (*Pontoporia blainvillei*)

Verglichen mit anderen kleinen Zahnwalen (s.u.) erscheinen die primären Projektionsareale des La Plata-Delphins (Sammlungscode: SPEC 2969, vgl. Tab. 2.2-1) vergleichsweise zellarm. Den meisten Arealen (M1, S1, A1) gemeinsam ist eine relativ breite Molekularschicht oder **Lamina molecularis (Lamina I, L I)**; lediglich in V1 ist L I nur etwa halb so dick .

Die **Lamina granularis externa (L II)** dieses Zahnwals ist generell recht schmal, aber zelldicht und vergleichsweise zellreich und daher einigermaßen eindrucksvoll. Sie besteht aus kleinen Pyramidenzellen; ein deutlicher Hinweis auf die allgemeine Pyramidisierung des Neokortex bei Zahnwalen. In der Reihenfolge M1- V1 scheint beim La-Plata-Delphin das Kaliber dieser kleinen Pyramiden abzunehmen und damit auch die Prägnanz der Schicht insgesamt, während sich die kleineren Zellen dadurch gleichzeitig deutlicher voneinander absetzen.

Die **Lamina pyramidalis externa (L III)** scheint in S1, A1 und V1 etwas breiter als in M1. Sie beherbergt generell etwas größere Pyramidenzellen als L II, welche in Richtung Album noch an Größe zunehmen. Gleichzeitig ist die Schicht eher zellarm, wobei es in der Reihung M1- V1 offenbar eine gewisse Zunahme der Zelldichte gibt: Während die L III von M1 nur wenige größere Neuronen umfaßt, wirkt sie in S1 etwas zellreicher und dieser Effekt scheint bei A1 maximal, während die Neuronen von V1 kleinere Kaliber aufweisen.

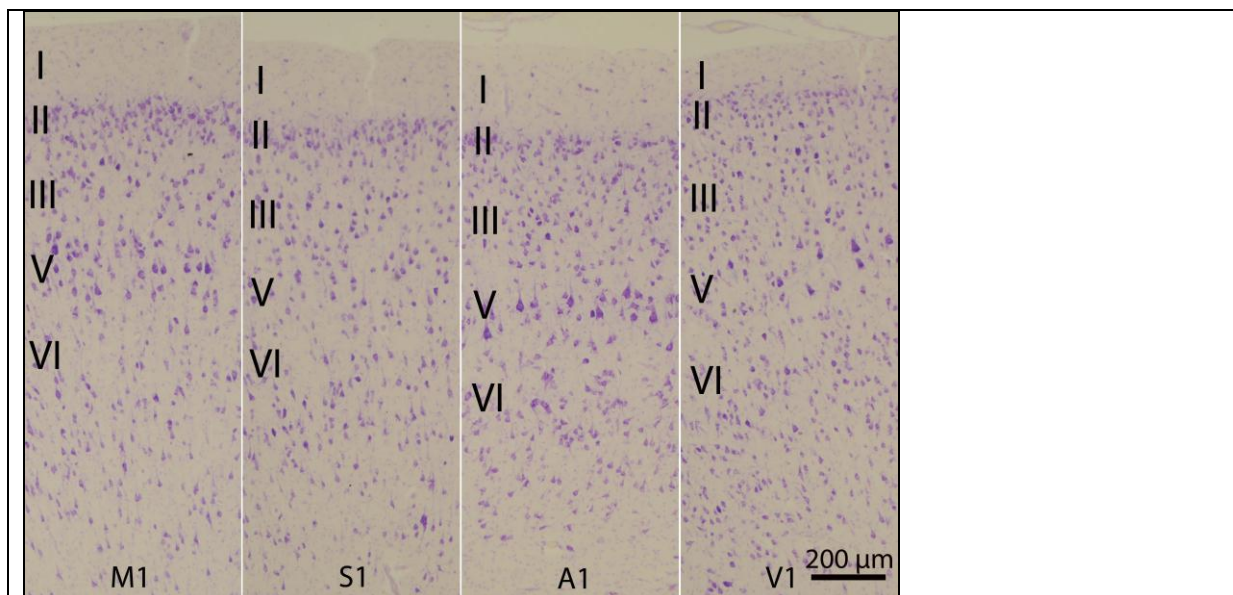
Eine **Lamina granularis interna (L IV)** ist im Nissl-Bild generell nicht erkennbar.

Die **Lamina pyramidalis interna (L V)** ist meist charakterisiert durch besonders große Pyramiden. Allerdings sind sie nur bei M1, A1 und teilweise V1

vergleichsweise sehr groß, wobei interessanterweise A1 die maximalen Zell-Kaliber aufweist und nicht M1!

Die Neuronen der **Lamina multiformis (L VI)** sind bei S1 und V1 kaum größer als jene in L III. Sie fallen in V1 etwas stärker ins Auge, weil die Neuronen in diesem Areal generell zwar prägnant und relativ zahlreich sind, aber klein wirken. L VI (Lamina multiformis) ist allgemein relativ breit und basal unscharf begrenzt; ihre meist kleinen multiformen Zellen ziehen sich hier noch weit ins Album hinein. Lediglich in A1 sind die Neuronen teilweise deutlich größer, passend zu L V von A1, deren beim La Plata-Delphin maximal große Zellen besonders beeindruckend.

Insgesamt also zeigt dieser Kortex die für Zahnwale typischen Eigenschaften von Agranularität (Fehlen der Schicht IV) und Pyramidisierung (Pyramidenzellen als vorherrschender Zelltyp).



**Abb. 3.2-1: Vergleich der vier primären Kortexareale des La-Plata-Delphins (*Pontoporia blainvillei*, # SPEC 2969) im Nissl-Zellbild.**

Sammlung Dr. Senckenbergische Anatomie, Frankfurt a.M. (s. Tab. 2.2-1).

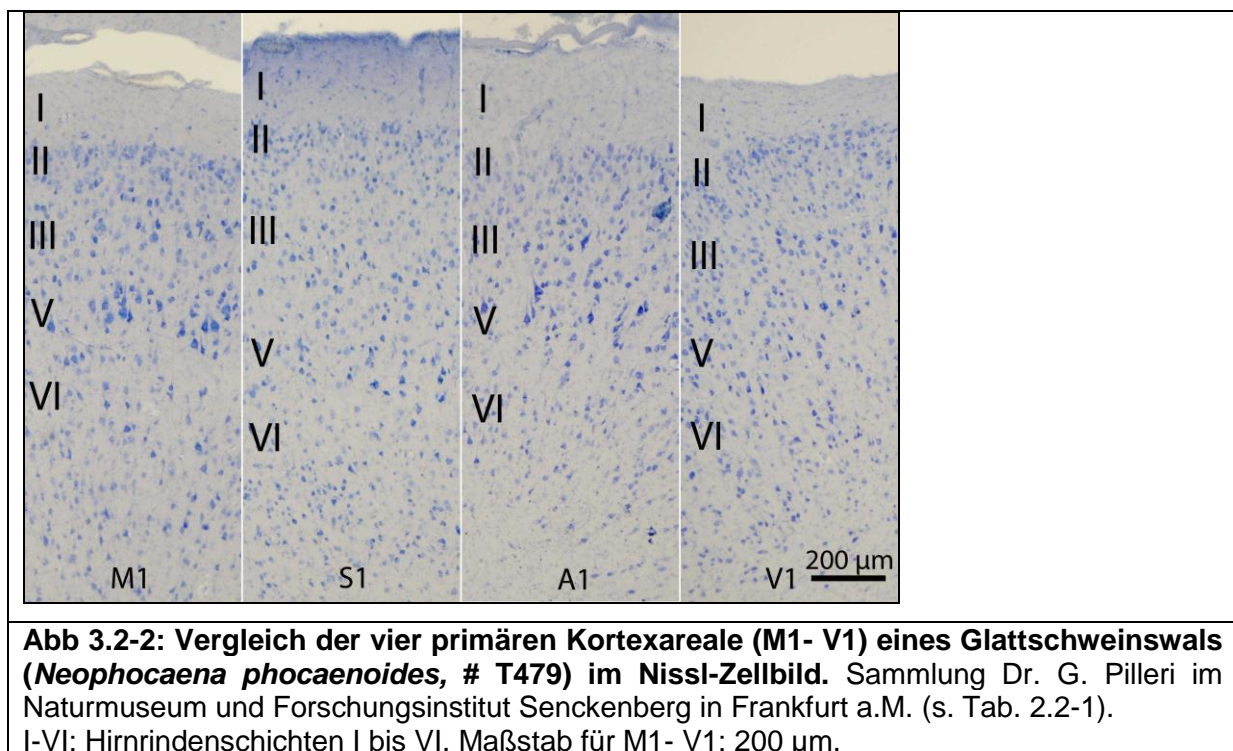
I-VI: Hirnrindenschichten I bis VI. Maßstab für M1- V1: 200 µm.

### 3.2.2 Glattschweinswal (*Neophocaena phocaenoides*)

Der Neokortex des Glattschweinswals (*Neophocaena phocaenoides*; Sammlungscode #T479, vgl. Tab. 2.2-1) entspricht im Prinzip recht gut der Situation des oben beschriebenen La-Plata-Delphins (vgl. Abb. 3.2-1). In der Dicke entsprechen die einzelnen Areale weitgehend denen von *Pontoporia*, auch



in der Breite der **Molekularschicht (L I)**, wobei jene von V1 wiederum nur halb so breit zu sein scheint wie bei den anderen Arealen. **L II** ist wiederum recht schmal, aber in allen Arealen einigermaßen gleich charakteristisch. **L III** ist bei *Neophocaena* lokal etwas breiter und die Somata sind tendenziell etwas größer als bei *Pontoporia*, was der Situation beim Amazonasdelphin (*Inia geoffrensis*, vgl. Abb. 3.2-3) ähnelt. In den beiden Regionen S1 und V1 sind die Neuronen insgesamt recht homogen verteilt. Große Pyramiden sind in nennenswerter Zahl nur in M1 und A1 vorhanden (zahlreicher und größer in M1), mittelgroße Neuronen finden sich vereinzelt in S1 und V1.



### 3.2.3 Amazonasdelphin (*Inia geoffrensis*)

#### Exemplar 1 (*Inia geoffrensis* T 419 ):

Verglichen mit der Situation bei *Pontoporia* (Abb. 3.2-1) ist der Kortex von *Inia geoffrensis* insgesamt etwas dicker (was vermutlich der größeren Hirnmasse bei *Inia* geschuldet ist; s. Tab. 2.2-2), aber recht ähnlich organisiert, und die Neuronen scheinen tendenziell größer als bei *Pontoporia*. Ein echtes ‚raindrop pattern‘ (s.u.) in A1 wie bei echten Delphinen (s.u.) ist weder bei *Pontoporia* noch bei *Inia* offensichtlich.

Die **Lamina molecularis (L I)** ist bei *Inia* ebenfalls fast stets breiter als bei *Pontoporia* (Kortizes M1, S1, A1). Die Proportionen innerhalb der Kortex- Areale scheinen gewahrt, denn die Molekularis des visuellen Areals V1 ist wie bei *Pontoporia* und *Neophocaena* lediglich halb so dick wie bei den anderen Arealen (Abb. 3.2-3).

Die **Lamina granularis externa (L II)** von *Inia* ist wiederum schmal und zelldicht, wobei sich die Charakteristik bei M1- V1 durch die Verbreiterung bzw. Auflockerung der Schicht verringert, so dass im Falle von V1 nur noch eine wenig eindrucksvolle Zone resultiert.

Die **Lamina pyramidalis externa (L III)** ist beim Amazonas-Delphin stets zelldichter als beim Glattschweinswal, wobei sich die Unterschiede bei A1 und V1 langsam auszugleichen scheinen.

Eine **Lamina granularis interna (L IV)** ist auch bei *Inia* nicht erkennbar.

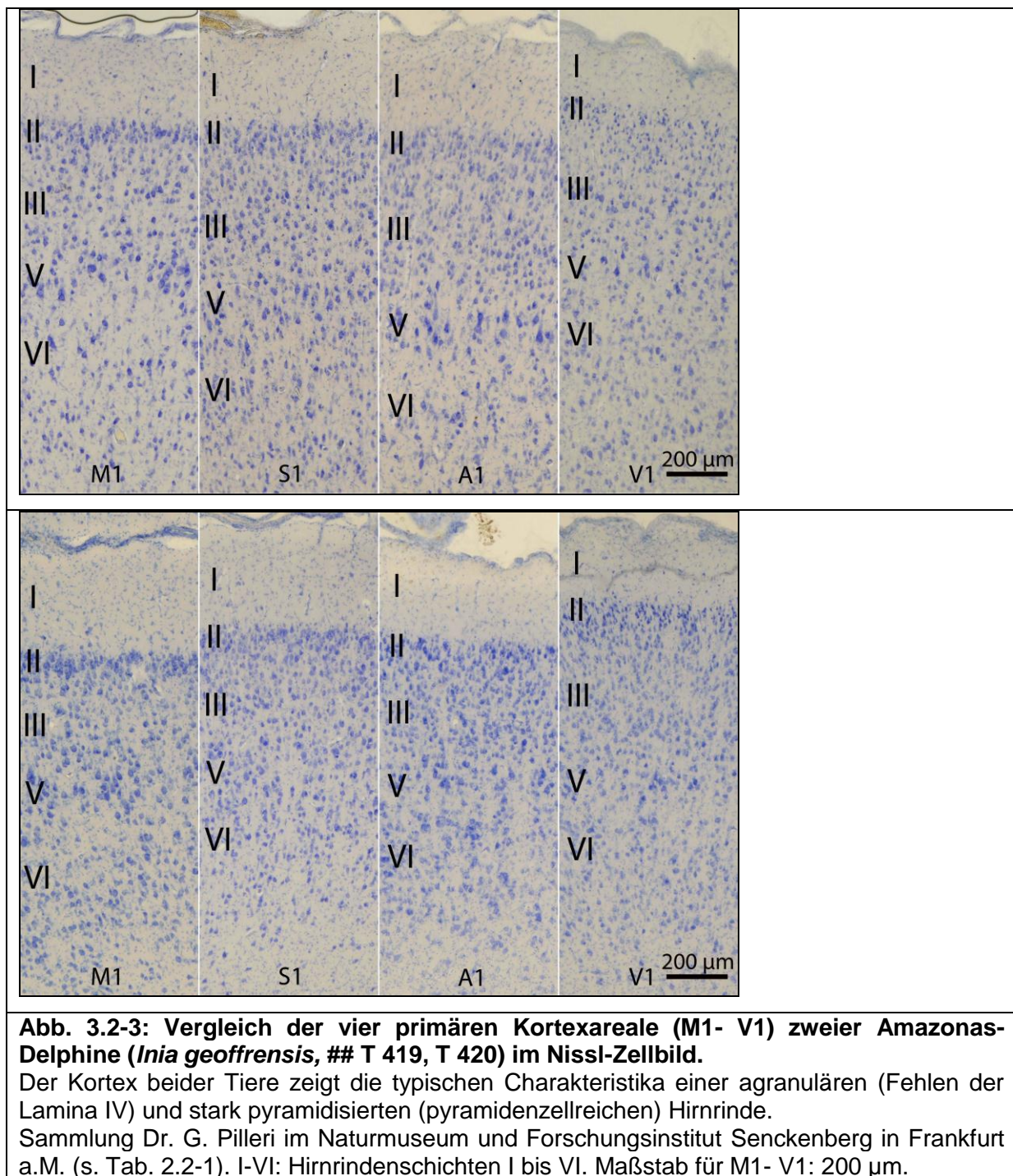
Die **Lamina pyramidalis interna (L V)** ist bei *Inia* ebenso prominent wie bei *Pontoporia*, dabei aber (der Hirngröße entsprechend) deutlich breiter. Ähnlich wie bei *Pontoporia* befinden sich in M1 und A1 die magnozellulären Neuronen in der oberflächlichen Hälfte von L V, während die tiefe Hälfte zellarm und faserreich ist. Auch ist die Schicht bei M1 und A1 besonders magnozellulär, wobei sich die Somata, anders als beim La Plata-Delphin, hier in ihrer Größe nicht unterscheiden. S1 dagegen weist bei *Pontoporia* und *Inia* für L III und L V ein Kontinuum von mittelgroßen Neuronen auf, ähnlich wie auch V1, wo beide Schichten allerdings weniger homogen sind und etwas schmaler erscheinen und wo in L V regelmäßig einige wenige große Pyramidenzellen imponieren.

Die **Lamina multiformis (L VI)** ist bei *Inia* fast durchgängig so wenig auffällig wie bei *Pontoporia* und läuft ebenso allmählich im darunterliegenden Album aus; allerdings weist sie bei *Inia* eine deutlich höhere Zelldichte auf. Eine weitere Gemeinsamkeit beider Spezies besteht darin, dass L VI bei A1 deutlich größere Somata aufweist als bei den anderen Kortizes.

### **Exemplar 2 (*Inia geoffrensis* T 420)**

Dieses zweite Exemplar stimmt mit T 419 im Bau der primären Neokortex-Areale recht gut überein (z.B. breite L I in M1- A1, keine L IV), doch gibt es auch einige kleinere Abweichungen:

Bei T 420 ist in V1 die **Molekularis (L I)** genauso breit wie in M1, S1 und A1. **L II** ist durchgehend gut kontrastiert. In **L III** nimmt die Zellgröße bei M1 kontinuierlich zu; ansonsten weist die untere Hälfte von L III auch in S1- V1 stets die größeren Neuronen auf, sodass gewissermaßen zwei Sublaminae unterschieden werden können.

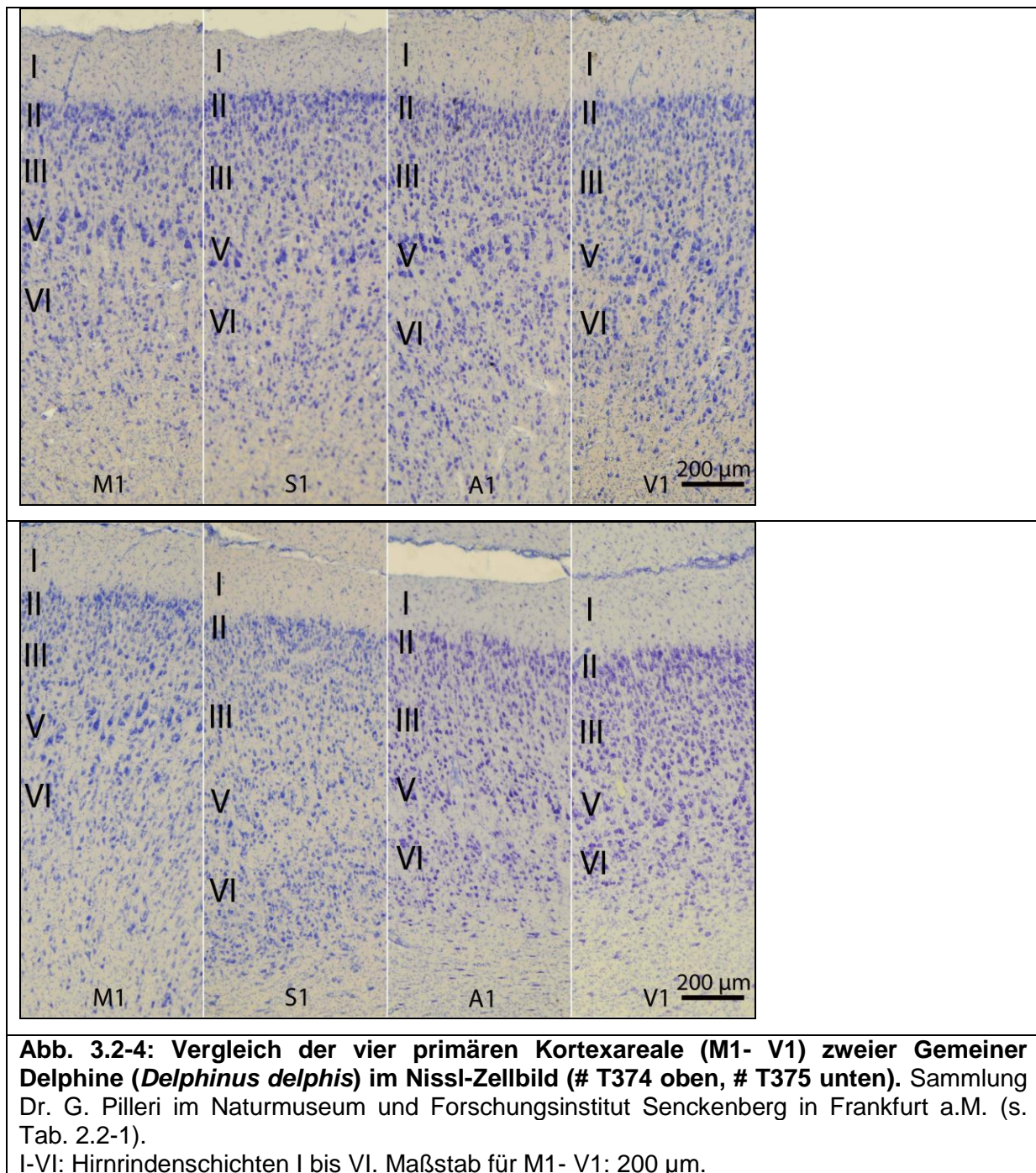


### 3.2.4 Gemeiner Delphin (*Delphinus delphis*)

Bei den beiden hier bearbeiteten Gemeinen Delphinen handelt es sich um die Exemplare "T374" und "T375" aus der Sammlung des Naturmuseums und Forschungsinstituts Senckenberg in Frankfurt a.M. (s. Tab. 2.2-1).

Der Neokortex des Gemeinen Delphins (*Delphinus delphis*) entspricht im Hinblick auf seine Schichtengliederung und Neuronenmorphologie recht gut der Situation bei den bisher besprochenen Zahnwalen (vgl. Abb. 3.2-1 bis 3.2-4). In der Gesamtdicke entsprechen die einzelnen Kortizes weitgehend denen von *Inia*, wobei allerdings sowohl die **Molekularschicht (L I)** von M1 und S1 als auch die Schichten III-V in den Arealen M1-A1 von *Delphinus* schmaler zu sein scheint. Die Zelldichte scheint bei *Delphinus* generell etwas höher zu sein als bei *Inia*, wobei in M1-V1 vor allem kleine Neuronen hinzugekommen sind (Ausnahme: L III und L V in M1, deren Neuronen generell kleiner sind als bei *Inia* sowie das Areal A1, welches insgesamt zahlreiche kleine Neuronen präsentiert). Die größten Pyramidenzellen befinden sich bei *Delphinus* somit in M1 (L V), wo das Zellkaliber ansonsten generell ebenfalls kleiner ist als bei *Inia*; bei *Pontoporia* ist die Situation umgekehrt (Schicht V- Pyramidenzellen in A1 größer als in M1). Anders als bei *Pontoporia* und *Inia* ist in S1 von *Delphinus* # 374 das Zell-Kontinuum in den Schichten L III-L VI durch eine Betonung der großen Pyramiden in L V mehr oder minder unterbrochen, nicht aber bei *Delphinus* # 375 (Abb. 3.2-4). Im übrigen sind die Somata der Pyramidenzellen in M1 bei *Inia* und *Delphinus* deutlich größer als bei *Pontoporia*. Die Zunahme der Zellgröße in der Tiefe von L III ist in M1 von *Delphinus* deutlicher ausgeprägt als bei *Inia*. Ein typisches Regentropfen-Muster in A1 (raindrop pattern) ist bei *Delphinus* nur mit Mühe zu erkennen. Insgesamt wirken die Kortizes von *Delphinus* durch den größeren Zellreichtum komplizierter und filigraner, wobei die Dominanz der Riesenpyramidenzellen in M1 über die von A1 überrascht.



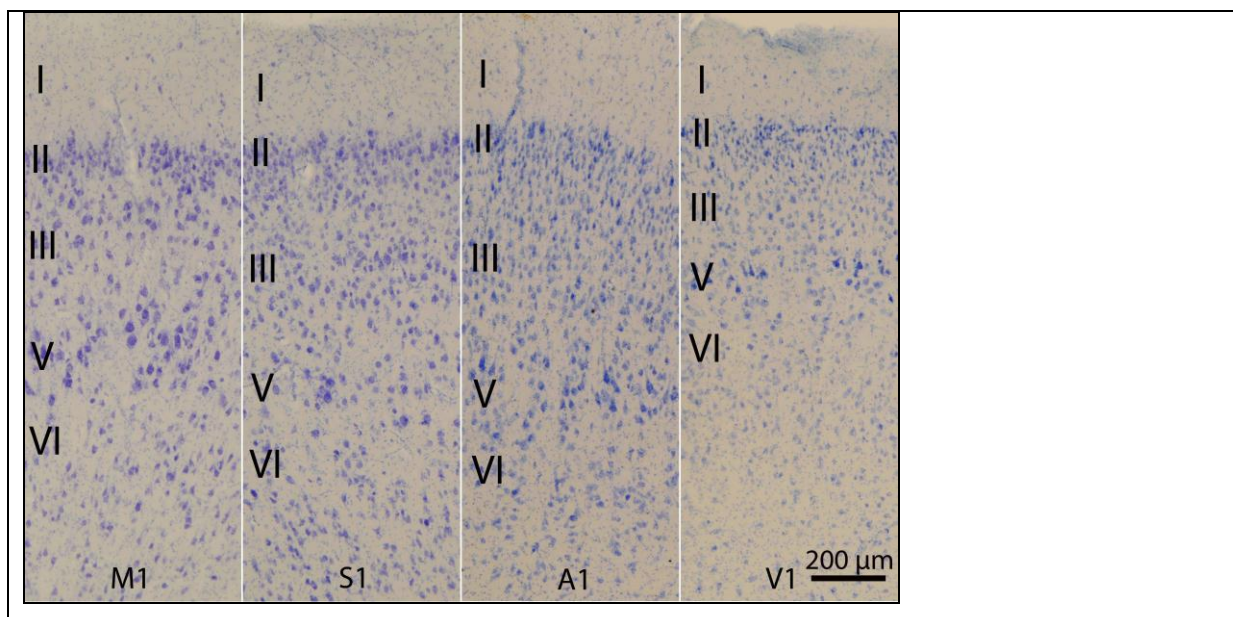


### 3.2.5 Großer Tümmler (*Tursiops truncatus*)

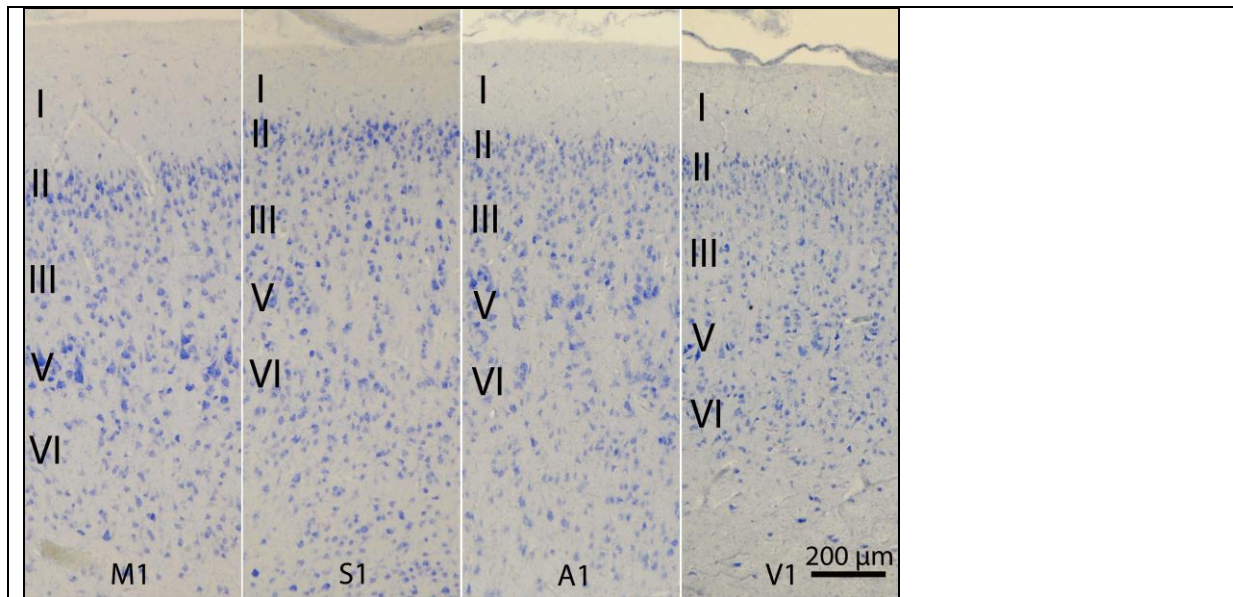
Der Neokortex der untersuchten Großen Tümmler (## T303, T441; s. Tab. 2.2-1) zeigt im Prinzip dieselbe Schichtengliederung und Neuronenmorphologie wie bei den bisher besprochenen Zahnwalen (vgl. Abb. 3.2-1 bis 3.2-4).

In der Dicke entsprechen die einzelnen Areale weitgehend denen von *Delphinus* (Abb. 3.2-4), dagegen stellen sich M1- A1 in *Tursiops* zellärmer dar, vor allem in den tieferen Schichten (**L III- L V**) und das offensichtlich auf Kosten der parvozellulären

Neuronen und der Homogenität der Schichten. Da sich die Neuronen hier im wesentlichen aus mittelgroßen bis sehr großen Pyramiden rekrutieren, erscheint das Nissl-Bild vergleichsweise grob und lückenhaft (L III bis L VI in M1 und S1). Die **Lamina molecularis (L I)** ist bei *Tursiops* generell dicker als bei *Delphinus*. Innerhalb des Großen Tümmlers ist sie wiederum bei M1 erheblich dicker als in den Arealen S1 bis V1. Die weitaus größten Pyramidenzellen befinden sich auch bei *Tursiops* in **L V** von M1, während in dieser Schicht bei S1 und V1 immerhin einige etwas kleinere Pyramidenzellen imponieren können (A1). Im übrigen scheinen die Pyramiden-Somata in M1 bei *Tursiops* nicht oder nur wenig größer als bei *Inia* und *Delphinus*, wohl aber um ein Mehrfaches größer als bei *Pontoporia*. Ein typisches Regentropfen-Muster in A1 (raindrop pattern) ist bei *Tursiops* nur schwach zu erkennen. Insgesamt gesehen wirken die Kortexes von *Tursiops* zellärmer und weniger komplex als die von *Delphinus* und erinnern hierin an die Situation bei *Neophocoena* (Glattschweinswal) und *Inia* (Amazonas-Delphin).







**Abb. 3.2-5: Vergleich der vier primären Kortexareale (M1- V1) zweier Großer Tümmler (*Tursiops truncatus*; #T303 oben und #T441 unten) im Nissl-Zellbild.**

Sammlung Dr. G. Pilleri im Naturmuseum und Forschungsinstitut Senckenberg in Frankfurt a.M. (s. Tab. 2.2-1). I-VI: Hirnrindenschichten I bis VI. Maßstab für M1- V1: 200 µm.

### 3.3 Die primären Rindenfelder bei Huftier, Raubtier und Primaten in der Nissl-Färbung

Nach der Besprechung der kortikalen Charakteristika bei einer Reihe von Zahnwalen (siehe 3.2) geht es im Folgenden um die Kortexmerkmale bei fünf ausgewählten Landsäugetieren: Schwein, Schaf, Hund, Gorilla und Mensch. Die beprobten Gehirne entstammen den in Tab. 2.2-3 aufgeführten Institutionen. Da diese Abbildungen (3.3-1 - 3.3-5) sämtlich von Gefrierschnitten stammen (Schnittdicke 60 µm), sind sie nur eingeschränkt mit den denen von Celloidinschnitten (Abb. 3.2-1 - 3.2-5) zu vergleichen (Schnittdicke 20-35 µm).

Ähnlich dem Vorgehen in Kapitel 3.2 wird auch hier das Hauptaugenmerk auf den Vergleich verschiedener Rindenareale innerhalb eines Individuums gelegt: das motorische Primärfeld (M1), das somatosensible Primärfeld (S1), das auditorische Primärfeld (A1) und das visuelle Primärfeld (V1). Die Abbildungen für die einzelnen Kortizes sind dabei wiederum stets in derselben Reihenfolge (M1, S1, A1, V1) angeordnet.

### 3.3.1 Hausschwein (*Sus scrofa f. domestica*)

Der Kortex dieser Spezies zeigt beim Vergleich der primären Areale zueinander folgende Merkmale (siehe Abbildung 3.3-1):

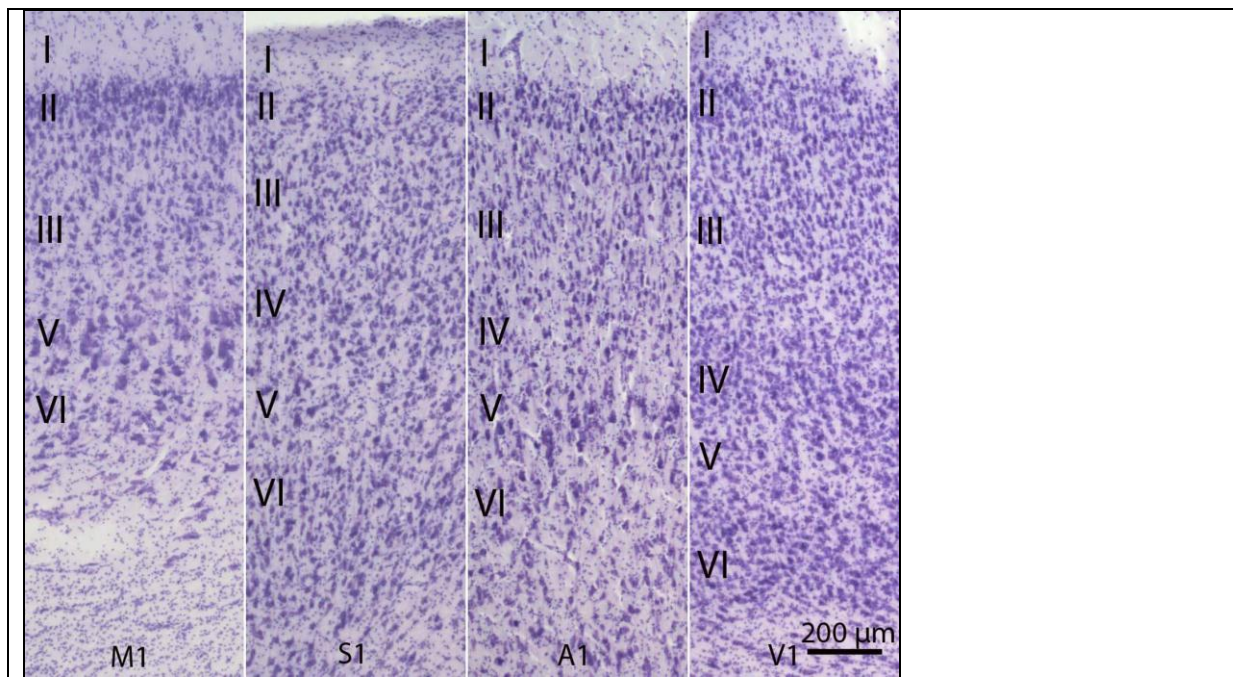
Im **Areal M1** des Hausschweins folgt auf eine mäßig breite Lamina I (L I) eine relativ zell-dichte und meist deutlich kontrastierte Lamina II (L II). Eine mit S1, A1 und V1 in der Breite übereinstimmende, jedoch gröber gestaltete Lamina III (L III) enthält bei M1 eine Vielzahl mittelgroßer Pyramidenzellen, deren Größe zuweilen in den tieferen Anteilen dieser Schicht leicht zunimmt. Lamina V (L V) ist überaus markant und enthält eine Vielzahl sehr großer Pyramidenzellen, welche denen des Schweinswals und des Großen Tümmlers (alle Schnitte sind Gefrierschnitte bei 60µm) in der Größe der Somata zu entsprechen scheinen (vgl. Kern et al. 2011). Lamina VI (L VI) wirkt ebenfalls relativ großzellig und ist hier gut gegen das Album abgesetzt. In M1 ist keine klare granuläre Schicht IV erkennbar.

Im **Areal S1** ist die Größe und Verteilung der stattlichen Neuronen sehr viel homogener; hier findet sich unter einer relativ schmalen L I eine unauffällige L II, eine mit der in A1 und V1 vergleichbar dicht gepackte L III und eine deutliche L IV (insbesondere bei höherer Vergrößerung gut erkennbar). L V zeigt in diesem Areal mittelgroße Pyramidenzellen und wirkt wenig auffällig. L VI enthält eine Vielzahl kleinerer Neuronen und reicht bis weit in das Album hinein.

Das **Areal A1** enthält eine mäßig breite L I, eine relativ zellreiche und betonte L II, eine eher kleinzellige, breite L III (auch hier liegen in den tiefen Anteilen vereinzelt größere Pyramidenzellen) und eine etwas weniger zell-dichte L IV. Die Schicht L V ist im Vergleich mit den homologen Schichten in S1 und V1 durch vereinzelt größere Pyramidenzellen einigermaßen prominent, die jedoch nicht das Kaliber der Somata in L V von M1 erreichen. Schicht VI wirkt mischzellig und eher spärlich mit Perikarya besetzt.

In **Areal V1** erkennt man eine eher schmale L I (in Abb. 3.3.-1 lediglich undeutlich zu erkennen) und darunter eine L II, die im Vergleich zu denen in A1 und besonders in M1 wenig akzentuiert wirkt. L III dagegen ist durch eine überaus hohe Dichte kleiner Pyramidenzellen charakterisiert (sie ist deutlich ausgeprägter als in S1 und A1). Die darunter liegende L IV ist im Vergleich mit denen in S1 und A1 äußerst zellreich und besonders dicht gepackt. L V wirkt unauffällig und enthält so gut wie keine größeren Pyramidenzellen. L VI erscheint relativ zell-dicht und ähnlich L IV quasi als dunklere „Bande“ gut abgrenzbar.





**Abb 3.3-1: Vergleich der vier primären Kortextareale des Schweins (*Sus scrofa*) im Nissl-Zellbild.**

Für Details s. Text. Beachte das eher vertikal organisierte und kolumnär anmutende Zellbild in A1 sowie die überaus zellreiche und feinkörnige (granuläre) Konsistenz in V1.

I-VI: Hirnrindenschichten I bis VI. Maßstab für M1- V1: 200 µm.

Sammlung Dr. Senckenbergische Anatomie, Frankfurt am Main.

### 3.3.2 Schaf (*Ovis ammon f. domestica*)

Der Kortex dieses Tieres offenbart bei genauer Betrachtung der einzelnen Areale spezifische Besonderheiten (siehe Abb. 3.3-2). Die Dicken der verschiedenen Areale stimmen gut mit der Situation beim Schwein überein, doch scheinen die Neuronen (Somata) beim Schaf (etwa gleiche Zelldichte) meist kleiner zu sein. Dies gilt offenbar auch für die großen Pyramidenzellen in M1. L II ist beim Schaf generell wenig akzentuiert.

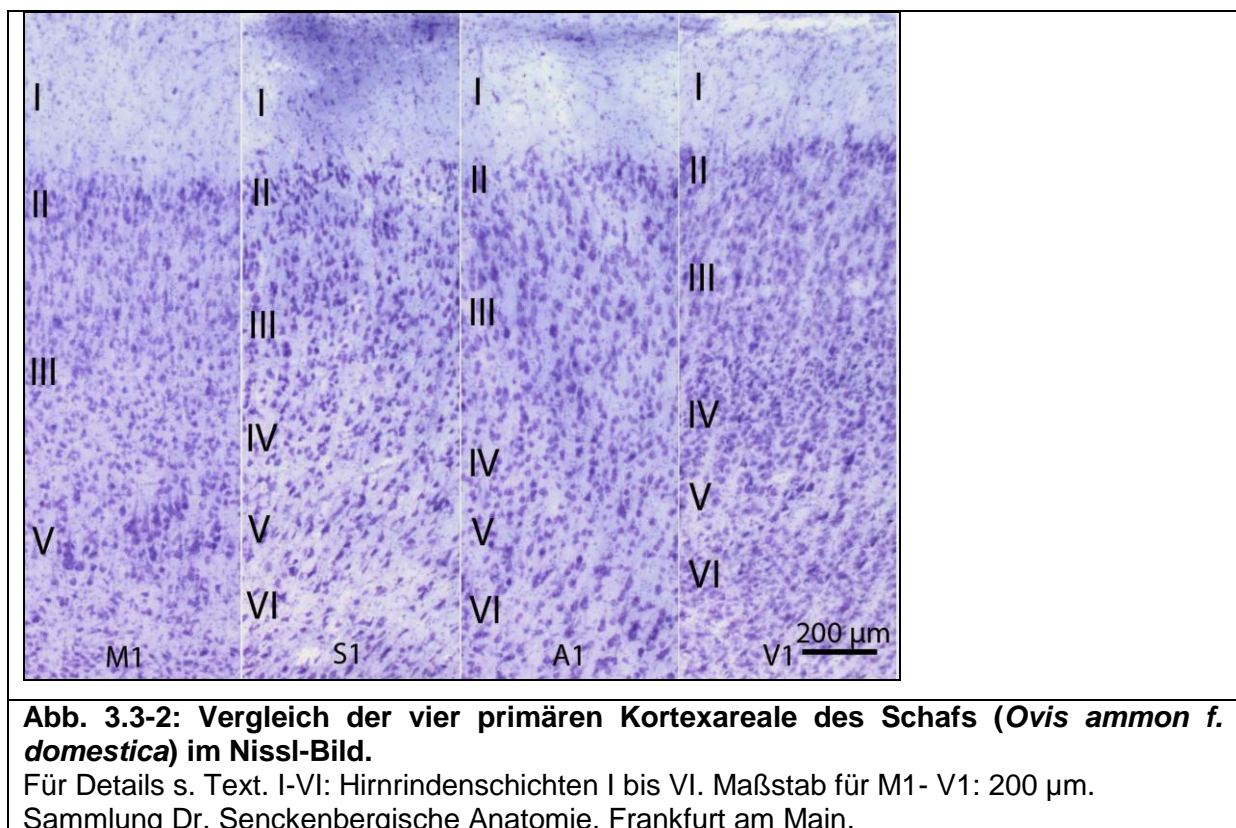
Im **Areal M1** ist L I sehr breit, L II im Vergleich zum Schwein mäßig betont, L III sehr breit (auch im Vergleich zum Schwein), wobei die Zelldichte albumwärts abnimmt. L V ist deutlich zu erkennen und enthält die größten Pyramidenzellen, L VI ist gegen das Album unscharf begrenzt. Eine klare Schicht IV ist in diesem Areal nicht erkennbar.

Das **Areal S1** wirkt beim Schaf (ähnlich wie beim Schwein) insgesamt etwas weniger einheitlich. Es zeigt eine breite L I und eine eher unauffällige L II; L III ist ausgedehnt, aber weniger homogen als beim Schwein und die Zelldichte nimmt vom unteren Bereich von L III bis einschließlich L VI stark ab. L IV ist mäßig ausgeprägt, bildet

aber keine Bande; L V ist undeutlich und als hellere Zone erkennbar, L VI erscheint multiform.

Das **Areal A1** ist beim Schaf insgesamt vergleichsweise grob, aber homogen textiert. Auf die breite L I folgt eine mäßig dichte L II. L III enthält hier, im Vergleich zu M1, S1 und V1, vergleichsweise große Pyramidenzellen. L IV ist einigermaßen gut erkennbar, aber nicht als Bande entwickelt. L V ist hier (in Abb. 3.3-2 schräg nach rechts unten verlaufend) prägnanter als in S1 und V1; die Schicht weist eine Reihe großer Pyramidenzellen auf. L VI enthält verschiedene Zellformen und reicht weit ins Album hinein.

Das **Areal V1** zeigt eine mäßig breite L I, eine unauffällige L II und eine verhältnismäßig schmale und dichte L III sowie eine breite, parvozelluläre L IV, welche Bandencharakter hat (die Neuronentextur wirkt erheblich feiner als beim Schwein). L V ist hier (ähnlich wie in S1) zellulär unauffällig und tritt als hellere Zone in Erscheinung, während L VI kleinzellig und multiform ist.



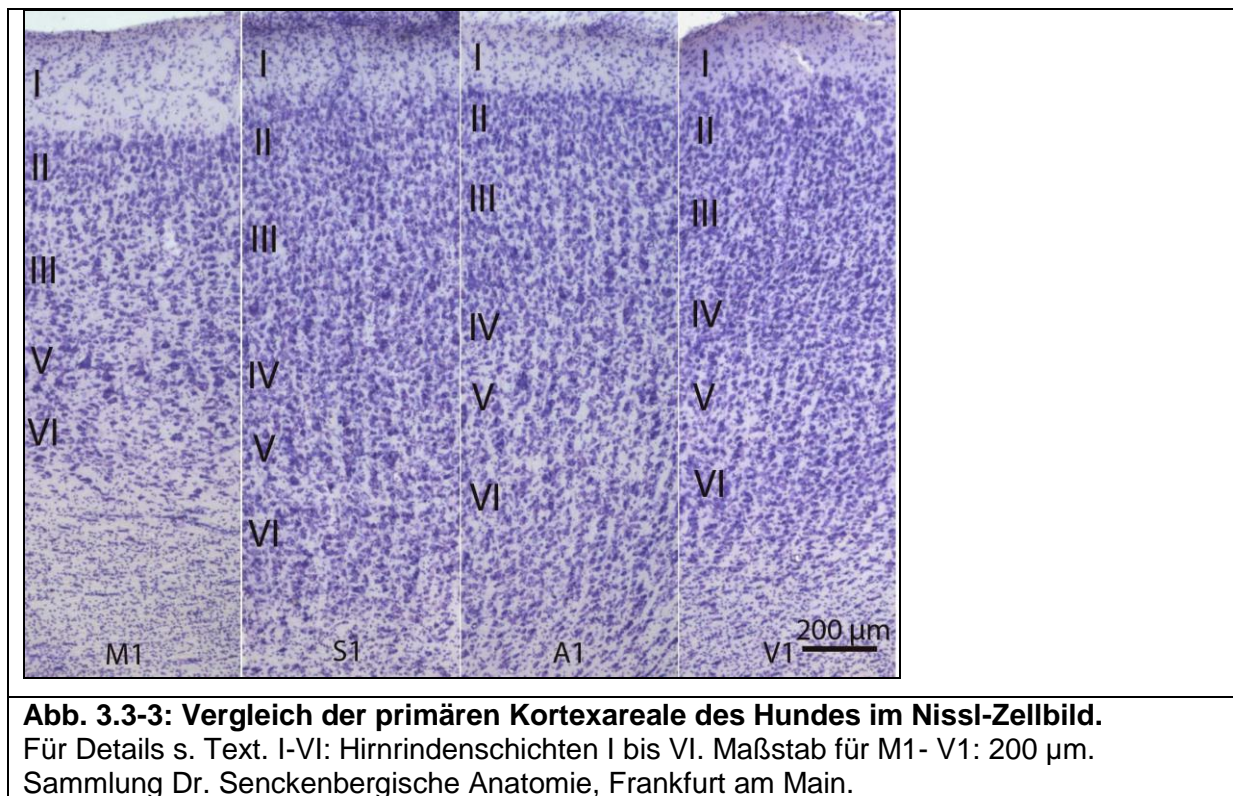
### 3.3.3 Hund (*Canis lupus familiaris*)

Im Vergleich zur Situation bei Schwein und Schaf sind die verschiedenen Kortizes beim Hund erstaunlich zell dicht und parvozellulär (vgl. Abb. 3.3-1, 3.3-2 und 3.3-3). Diesbezüglich kommen sie von allen hier untersuchten Kortizes denen der beiden Primaten (Gorilla, Mensch) am nächsten. Lamina I wirkt relativ zellreich und am breitesten angelegt in M1. L II ist wird fast nur als oberflächlicher Abschluss der Schichten L III- L VI wahrgenommen und geht nahezu homogen in L III über.

**Das Areal M1** ist vergleichsweise schmal und bis auf die oberflächliche Hälfte von L III, welche hier den zell dichtesten Bereich bildet, sind die Neuronen vergleichsweise locker angeordnet. L V ist durch einige größere Pyramidenneuronen gekennzeichnet, welche kleiner erscheinen als jene beim Schwein und eher denen des Schafs entsprechen. Die multiforme Schicht VI in M1 wirkt im Vergleich mit der Situation in S1, A1 und V1 relativ schmal. Eine granuläre Schicht IV ist in diesem Areal nicht erkennbar.

Die **Areale S1-V1** unterscheiden sich im Nissl-Bild nicht sehr: sie sind alle stark parvozellulär, erstaunlich zellreich und zell dicht, wobei beide Parameter in Richtung von V1 zuzunehmen scheinen: V1 ist beim Hund erheblich stärker granulär und viel zell dichter als beim Schaf, aber nicht so breit und nicht so stark in Banden gegliedert wie beim Gorilla, wo es zu einer umfassenden Miniaturisierung der Massen von Körnerzellen gekommen ist, v.a. im Falle von L IV (Abb. 3.3-2 - 3.3-4). Bei S1 und A1 (Hund) sind noch einige größere Pyramiden eingestreut (sowohl bei S1 und A1 im tiefen Anteil von L III und in L V). L IV ist generell parvozellulär, ganz besonders jedoch bei V1; hier bilden die feinen Körnerzellen eine deutliche Bande. L VI setzt sich in den Kortizes S1-V1 parvozellulär weit in das Album hinein fort. Das für A1 typische Regentropfenmuster ist auch beim Hund in A1 relativ gut erkennbar.





### 3.3.4 Gorilla (*Gorilla gorilla*)

Die Hirnrinde des Gorillas ist erheblich dicker als die der bisher besprochenen Säugetiere (vgl. Abb. 3.1-1 bis 3.3-4) und etwa ein Drittel dicker als beim Hund. Vor allem M1 ist beim Gorilla ungewöhnlich dick, was offenbar durch die extrem starke Entwicklung von L III zustandekommt; sie ist bei *Gorilla* etwa dreimal (!) so stark wie beim Hund. Schicht VI ist in M1 relativ ausgedehnt, konnte allerdings aus Gründen der Übersichtlichkeit (gleicher Maßstab für alle Areale) fototechnisch nicht in die Abbildung 3.3-4 eingeschlossen werden. Interessanterweise zeigen die beiden Kortizes M1 und V1 beim Primaten Gorilla (wie beim Primaten Mensch, Abb. 3.3-5) diametral entgegengesetzte Extreme von Kortexentwicklung im Bezug zu den zuvor beschriebenen Säugetieren: nämlich die Entwicklung von Betzschen Riesenpyramidenzellen in M1 und die maximale Granularisierung und Untergliederung von L IV in V1. Zumindest in morphologischer Hinsicht hat die Kortexevolution bei den Primaten ein bemerkenswertes Maximum an Versatilität und Differenzierung erreicht (s. Kap. 4.4).

Beim Gorilla zerfallen, ähnlich wie beim Hund gezeigt, die vier primären Kortizes morphologisch in zwei Gruppen: Während **Areal M1** vergleichsweise grob textiert ist, kommt es in der Reihenfolge **S1-V1** zunehmend zur Granularisierung der Neuronen,

d.h. die Zellgröße nimmt erstens deutlich ab, und es kommt zweitens zur Angleichung der Zellkaliber (Perikarya) in den verschiedenen Laminae.

In **Areal M1** ist L I vergleichsweise zellreich, L II als die für M1 zelldichteste Lamina scheint sehr gut entwickelt und geht allmählich in den sehr breiten oberen Bereich von L III über, welcher durch kleine und mittlere Pyramidenzellen charakterisiert ist. Zur Mitte von L III nehmen die Neuronen an Kaliber zu, um sich dann im Anschluss an eine schmale Zone mit kleinen Neuronen (direkt über L V) wieder mit mittelgroßen Neuronen anzureichern. Zwischen diesen mittelgroßen Zellen befinden sich viele sehr kleine Perikarya, welche sich bis in L V hinein fortsetzen. Die charakteristischen Riesenpyramidenzellen von L V sind beim Gorilla von ganz außerordentlicher Größe (Abb. 3.3-4); ihr Kaliber wird in dieser Region auch nicht beim Menschen erreicht (Abb. 3.3-5).

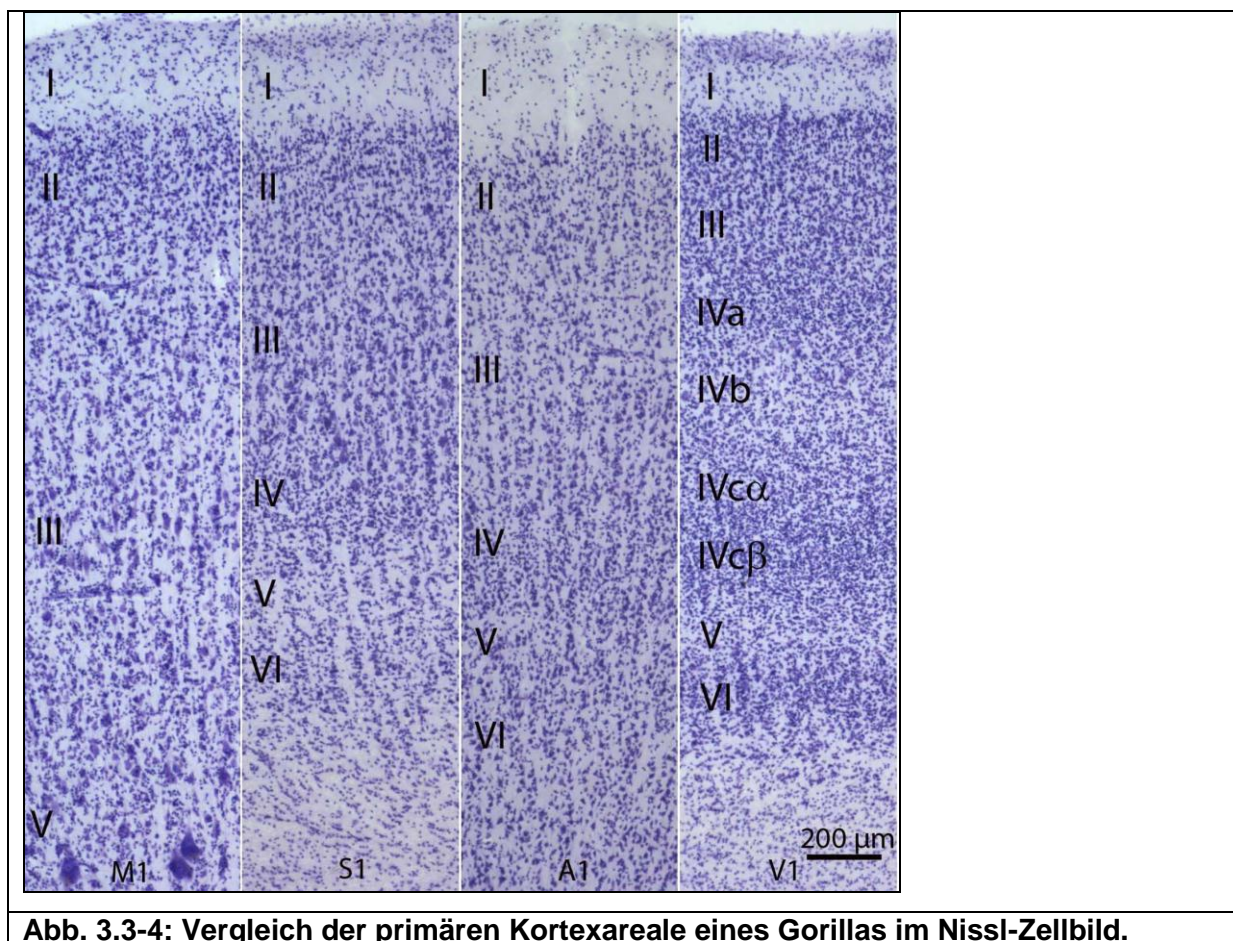
**Areal S1** wirkt im Vergleich zu M1 sehr viel homogener und generell deutlich kleinzelliger. L II und L III unterscheiden sich hier lediglich durch die allmähliche Dotierung des tieferen Bereichs von L III mit mittelgroßen Perikarya. L IV ist in A1 quasi identisch vorhanden; auch L V ist in beiden Arealen (S1, A1) recht ähnlich organisiert, wobei die Zellen in dieser Schicht in S1 bei fast gleichem Kaliber allerdings deutlich weniger dicht auftreten als in A1. Auch L VI ist in beiden Arealen morphologisch ähnlich, in A1 allerdings mangels mittelgroßer Zellen doch erheblich homogener als in S1.

**Areal A1** weist zu allen bisher schon genannten Charakteristika noch das sog. „raindrop pattern“ auf, welches offenbar bei Primaten wie dem Gorilla maximal gut entwickelt ist und an Spuren von Regentropfen an einer Glasscheibe erinnert. Histologisch dürften sich hinter diesem Phänomen Reste der entwicklungs-geschichtlich bedingten kolumnären Gliederung des Kortex verbergen, welche hier vermutlich für Besonderheiten in der Verarbeitung auditorischer Information stehen (vgl. Kap. 1.5 und 4.5).

**Areal V1** zeichnet sich beim Gorilla nicht nur durch eine maximale Zelldichte und damit verbunden eine generelle Miniaturisierung der Körnerzellen aus, sondern auch durch eine ungewöhnliche Bänderung in den verschiedenen Schichten infolge der lokalen erheblichen Zellverdichtung. Hier handelt es sich offenbar um Zonen extrem kleinteiliger, aber intensiver visueller Informationsverarbeitung. Die meisten dieser Bänder befinden sich in L IV, welche durch eine extreme Verdickung und ihre Unterteilung in verschiedene Sublaminae (IVa, IVb, IVc) imponiert. Das oberste

dieser neuen Bänder (IVa) ist stark parvozellulär und gleichzeitig von außerordentlich hoher Dichte. Es wird abgelöst durch Sublamina IVb, welche einen sehr viel geringeren Packungsdruck der Mini-Neuronen aufweist und daher als „Aufhellungszone“ imponiert. Sublamina IVc $\alpha$  stellt wiederum ein deutliches Band dar; sie enthält eine Unzahl noch winzigerer Neuronen, ohne die Dichte der Sublamina IVa zu erreichen.

Sublamina IVc $\beta$  (enthält v.a. bedornete Sternzellen, s. Kap. 4.3.1.1) weist beim Gorilla offenbar gleichzeitig ein Maximum an Zelldichte und ein Minimum an Zellkaliber auf und erscheint daher extrem feinkörnig und homogen. [Hier leuchtet der Begriff „Koniokortex“ (von griechisch „konios“: Sandkorn, Staub; Kahle 1975) unmittelbar ein.] Dagegen ist L V sehr schmal und durch einen stark verringerten Packungsdruck extrem feinkörniger und absolut homogen verteilter Zelleiber gekennzeichnet, was diese Lamina zu einer Aufhellungszone macht und innerhalb des Kortex der Säugetiere ebenfalls ein Extrem darstellt. Die multiforme L VI wiederum besteht aus einem inhomogenen Band von nicht ganz so kleinen Körnerzellen, welche gewissermaßen eine grobe kolumnäre Organisation aufweisen.



**Abb. 3.3-4: Vergleich der primären Kortexareale eines Gorillas im Nissl-Zellbild.**

### 3.3.5 Mensch (*Homo sapiens*)

Die Kortex-Areale des Menschen unterscheiden sich nicht sehr von der Situation beim bereits besprochenen Gorilla.

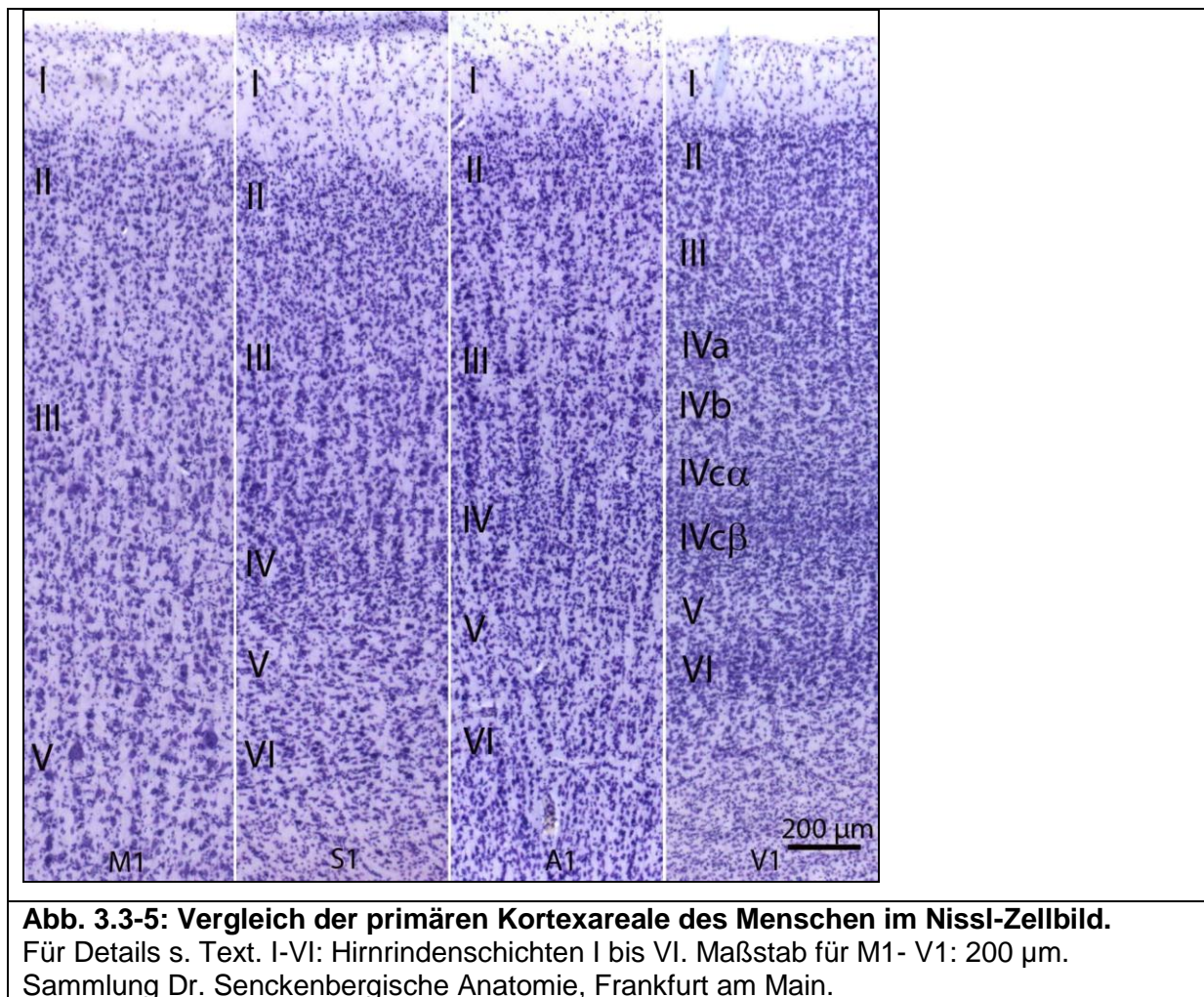
**Areal M1** weist beim Menschen in der Mitte und in der unteren Zone von L III etwas größere mittelgroße Pyramiden auf als beim Gorilla. Dafür sind die Betzschen Riesenzellen in L V in unseren Schnitten des menschlichen Kortex erheblich kleiner als beim Gorilla (vgl. Abb. 3.3-4, 3.3-5: M1 unten). Eine granuläre Schicht IV ist in M1 nicht identifizierbar. Schicht VI erscheint relativ weitläufig, ist allerdings aus Gründen der Maßstabstreue und eines maximalen Informationsgehalts der Abbildungen (gleiches Objektiv für alle Areale) in diesen nicht zu sehen.

**Areal S1** weist beim Menschen im mittleren Bereich des Kortex (untere Zone von L III) eine grob kolumnäre Anordnung der hier tendenziell größeren magnozellulären Pyramidenneuronen auf, die beim Gorilla nur angedeutet ist. Außerdem scheint Areal S1 beim Menschen deutlich dicker zu sein als beim Gorilla und reicht hier mit vergleichsweise größeren Pyramiden weit ins Album hinein.

**Areal A1** wirkt trotz eines klaren Regentropfenmusters gröber gegliedert als beim Gorilla; offenbar gibt es beim Menschen mehr Neuronen von mittlerem Kaliber, welche markanter zu Kolumnen zusammengefaßt sind. L IV ist hier quasi am unteren Ende der Kolumnen als vergleichsweise schmaler Streifen von Mini-Körnerzellen eingearbeitet. Teilweise setzt sich das 'raindrop pattern' noch bis in die Laminae V und VI fort.

**Areal V1** weist beim Menschen prinzipiell dieselbe Gliederung auf wie beim Gorilla, doch wirkt die Organisation des Kortex hier noch zellichter, was auf ein tendenziell etwas kleineres Kaliber der Körnerzellen zurückgehen dürfte; infolgedessen sind die Aufhellungszonen in IVb und V weniger ausgeprägt.





### 3.4 Charakteristika der kortikalen Neuronen bei Zahnwalen am Beispiel des Schweinswals (Rapid-Golgi-Imprägnation)

Der oben ausgeführten allgemeinen Begutachtung der Hirnrinde verschiedener Säugetier-Ordnungen bei schwacher Vergrößerung im Nissl-Zellbild folgt in diesem Abschnitt die Analyse einzelner kortikaler Neuronentypen mit Hilfe der Rapid-Golgi-Imprägnation.

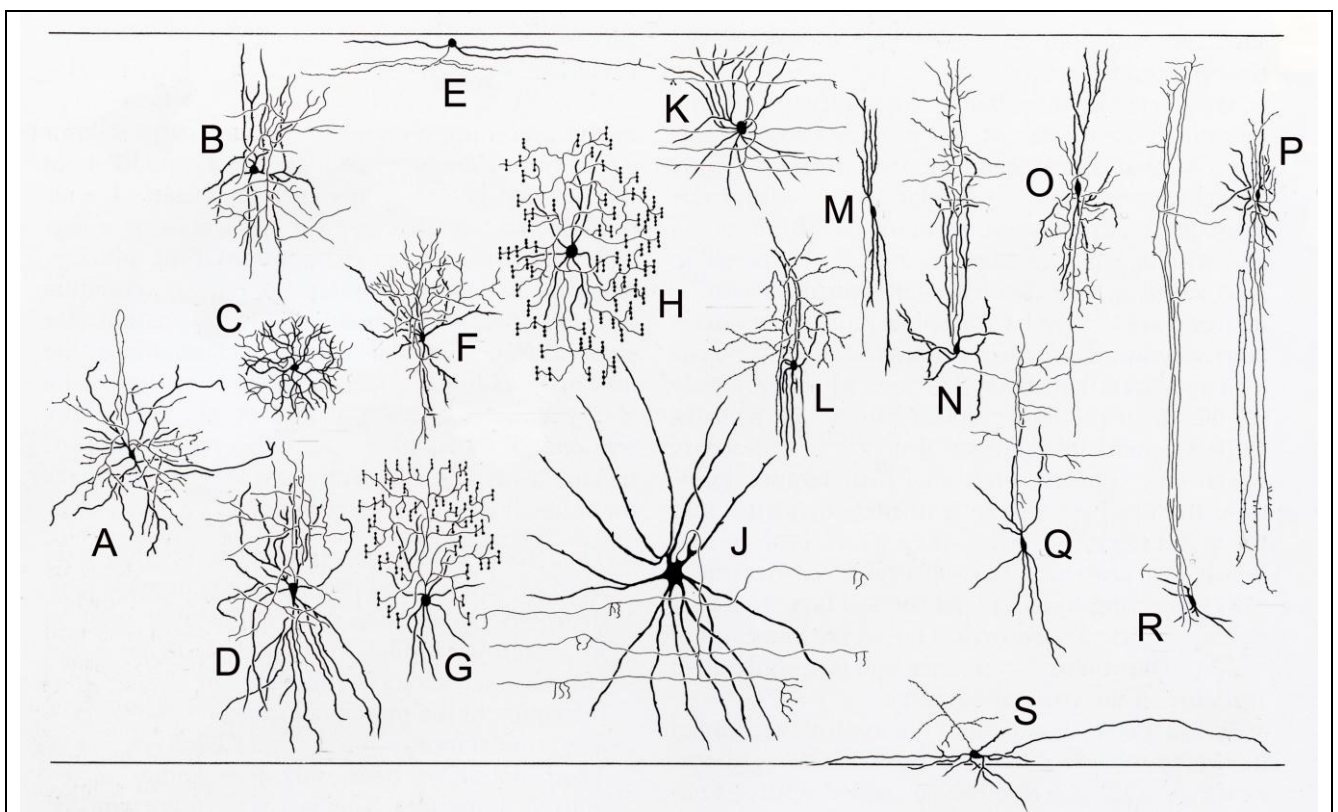
Da in der vorliegenden Arbeit insbesondere die tiefgreifende Analyse des Zahnwal-Neokortex im Fokus steht, wurde in diesem Kapitel die histologisch-experimentelle Bearbeitung mit Hilfe der Rapid-Golgi-Imprägnation an exemplarisch ausgewähltem Delphin-Material vorgenommen. Dabei handelt es sich um eine Probe des primär-somatosensiblen Areals (S1) eines Schweinswals (# PP 1729; Quelle: Forschungs- und Technologiezentrum Westküste, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).

Generell lässt sich beim Blick auf die Morphologie von Neuronentypen festhalten, dass sich im Laufe der Evolution gerade im Neokortex der Säugetiere eine Vielzahl



unterschiedlicher Neuronenarten herausgebildet hat. Diese Vielzahl basiert hauptsächlich auf einer enormen Bandbreite charakteristischer Interneuronen (Nieuwenhuys 1994, 1998) und ist für das Verständnis der Kortex-Funktion von entscheidender Bedeutung.

Für eine Einführung in die Variabilität der Interneuronen bei bisher ausführlich untersuchten Säugetieren und im Zusammenhang mit der Frage ihrer Vergleichbarkeit (Homologie oder Konvergenz?) bei den hier genauer untersuchten und noch wenig bekannten Delphinen gibt Abb. 3.4-1 eine allgemeine Synopsis der neokortikalen Interneuronen.



**Abb. 3.4-1: Überblick der neokortikalen Interneuronen bei verschiedenen Säugetieren.**

Gezeigt ist die Vielfalt unterschiedlicher Interneuronentypen (nachgewiesen in verschiedenen Säugetieren): multipolares Neuron (A, Ratte; B, Totenkopffäffchen), neurogliaforme Zelle (C, Totenkopffäffchen), Sternzelle (D, Makake; F, Ratte), Cajal-Retzius-Zelle (E, Igel), Kandelaberzelle (G, H, jeweils Makake), Korbzelle (J, K, jeweils Makake), bipolare Neuronen (L, M, N, jeweils Makake), Doppelbuschzelle (O, P, jeweils Makake; Q, Katze), Martinotti-Zelle (R, Katze), multiformes Neuron (S, Makake).

Aus Nieuwenhuys (1998), modifiziert.

Im Gegensatz zur Nissl-Färbung lässt die Rapid-Golgi-Imprägnation eine komplette Darstellung einzelner Neuronen zu (Rosoklija et al. 2003). Durch den Niederschlag von Silbersalzen im Gewebe werden also stets nur einzelne Zellen oder Zellgruppen

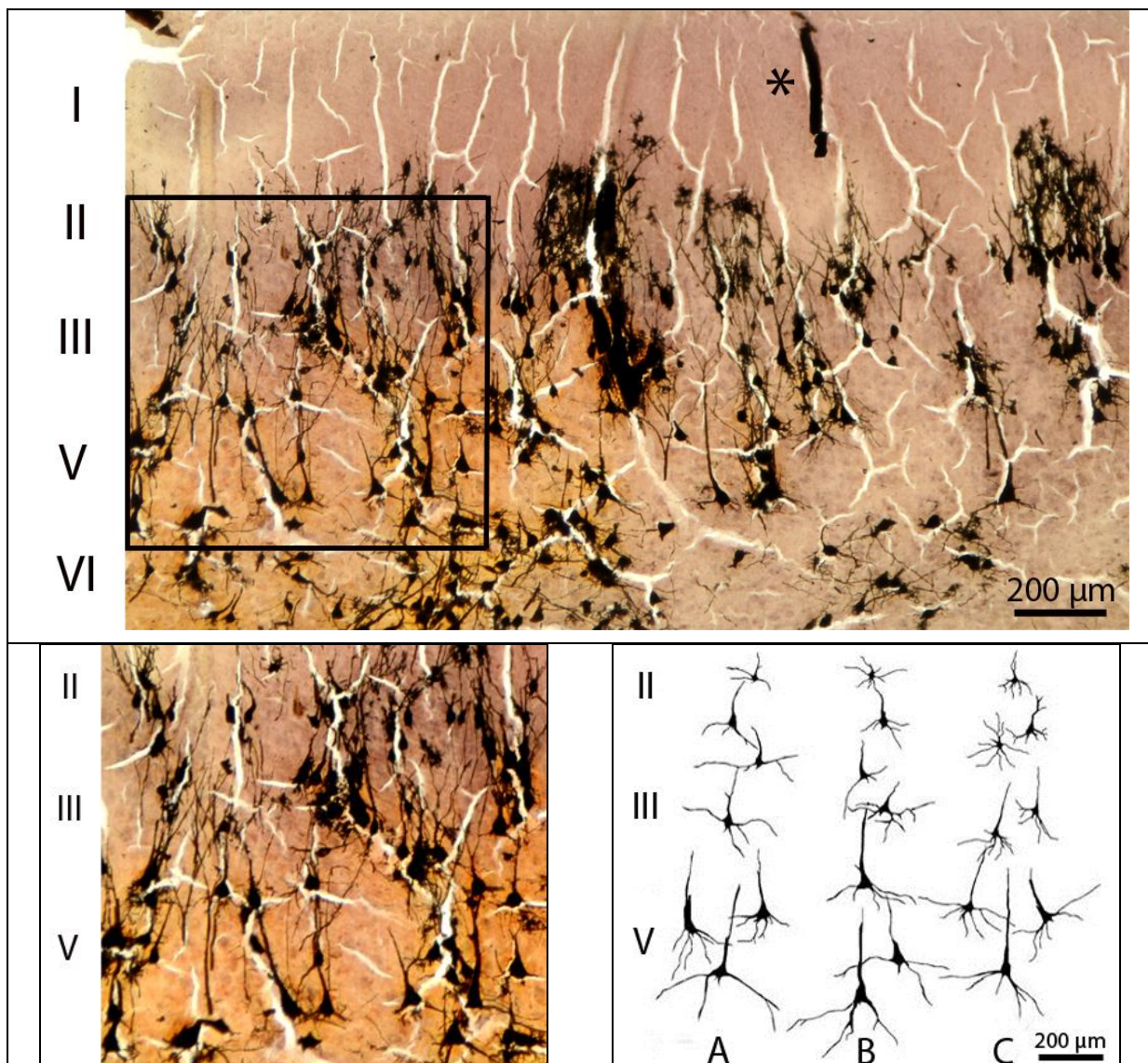
zufällig erfasst. Neben den Neuronen reagieren aber oft auch andere Strukturen bzw. Gewebe mit den Silbersalzen (Blutgefäße oder Gliazellen), und es entstehen Artefakte, welche differentialdiagnostisch erkannt werden müssen (z.B Kapillaren vs. Dendriten bzw. Axone) sowie übermäßige Niederschläge, welche eine Auswertung der Schnitte lokal erschweren oder verhindern.

Dennoch eignet sich die Rapid-Golgi-Imprägnation besonders gut für die Analyse einzelner Neuronentypen, da Zellkörper (Somata) und Zellfortsätze (Axone und Dendriten) gegen einen ungefärbten Hintergrund dargestellt werden. Das Ausmaß und die Qualität der Färbung wird dabei maßgeblich durch die Frische des Probenmaterials bedingt. Im unserem Fall ist Hirnmaterial von Delphinen in mehrfacher Hinsicht problematisch, da diese Tiere 1) meist sehr selten überhaupt für solche Untersuchungen zur Verfügung stehen, 2) durch das Washingtoner Artenschutzabkommen einer rigiden Protektion unterworfen sind und 3) post mortem meist zu schlecht erhalten sind, um anspruchsvollere bzw. empfindlichere Verfahren wie Versilberungen oder das Labeling spezifischer Antigene in Neuronen mit den Verfahren der Immunhistochemie zu ermöglichen (s. Kap. 3.5; Ferrer und Perera 1988). So werden bei Rapid-Golgi neben dem Zellkörper die Zellfortsätze oft nur im Ansatz erkennbar imprägniert. Detailmerkmale wie das Vorhandensein oder Fehlen einer Axon- bzw. Dendritenbedornung können dadurch kaum bis nicht berücksichtigt werden. Auch werden einzelne Rindenschichten aus unbekannten Gründen unterschiedlich gut dargestellt. Schicht I (L I) zum Beispiel zeigt in der vorliegenden Untersuchung allgemein ein äußerst schwaches "Färbe"-Ergebnis. So sind manche Zell-Typen dieser Schicht, wie z.B. die sogenannten ‚Cajal-Retzius-Zellen‘ (siehe Abb. 3.4-1, E) von der Imprägnation offenbar nicht erfasst worden und daher bei der folgenden Detailanalyse einzelner Neuronenformen in der Großhirnrinde des Schweinswals nicht berücksichtigt.

Die Bearbeitung und die Auswertung des Kortex-Materials erfolgt in Anlehnung an frühere Arbeiten zur Darstellung und Klassifizierung einzelner Neuronentypen unter Verwendung der Rapid-Golgi- oder der klassischen Golgi-Imprägnation (siehe Abb. 3.4-1; Kraus und Pilleri 1969a, 1969b; Pilleri und Kraus 1969; Kraus und Pilleri 1972; Werner et al. 1979; Garey et al. 1985; Morgane et al. 1986b; Ferrer und Perera 1988; Glezer et al. 1988; Glezer und Morgane 1990; Morgane und Glezer 1990; Morgane et al. 1990; Rosoklija et al. 2003; Furutani 2008). Beide Imprägnationen unterscheiden sich nur sehr wenig voneinander.

Die Abbildungen sind im Folgenden stets so angeordnet, dass der obere Bildteil der Kortex-Oberfläche, der untere Bildteil der Kortex-Tiefe zugewandt liegt. Sie sind, wie auch alle anderen Fotos in dieser Arbeit, ungeschönte Original-Dokumente.

Abbildung 3.4-2 zeigt die Übersicht einer Kortexregion von ca. 2 mm Breite. Die einzelnen Kortexschichten sind durch eine ‚Population‘ tiefschwarz gefärbter Neuronen charakterisiert. Bei genauerer Betrachtung erkennt man Zellkörper, Fortsätze und dazwischen eingestreute, clusterartige Artefakte (Mitte, \*).



**Abb. 3.4-2: Übersicht einer kleinen Kortex-Region des Schweinswals (*Phocoena phocoena*) mit Hilfe der Rapid-Golgi-Imprägnation.** Oben: Übersicht der Hirnrinde. Exemplarisch zeigen sich neben einem Ausfällungsartefakt (\* oben Mitte) eine Vielzahl imprägnierter Neuronen samt ihrer Fortsätze. Der gerahmte Ausschnitt dieser Abbildung ist im Bild *links unten* schwach vergrößert dargestellt. *Rechts unten* befindet sich eine schematische Gegenüberstellung einzelner Neuronen aus der Hirnrinde des Großen Tümmlers (A), des Streifendelphins (B) und des Risso-Delphins (C). C) wurde angefertigt mit Hilfe der "Camera lucida"-Methode (modifiziert nach Furutani 2008). I-VI: Hirnrindenschichten I bis VI.

Grundsätzlich lassen sich bei der morphologischen Analyse des Neokortex in Golgi-Präparaten zwei große Kategorien von Nervenzelltypen unterscheiden, nämlich *Pyramidenzellen* und *Nicht-Pyramidenzellen* (Rager et al. 2004). Dabei dienen sowohl die Form und Größe als auch die Schichtenzugehörigkeit der Neuronen als differentialdiagnostische Kriterien.

Im Folgenden werden beispielhaft Originalbefunde der wichtigsten Subtypen dieser beiden Neuronen-Klassen in der Endhirnrinde des Schweinswals gegeben. Dabei sind die in der vorliegenden Arbeit vorgelegten Original- Befunde unverändert und lediglich beschriftet.

### **3.4.1 Pyramidenzellen**

Die typische Form der Pyramidenzelle ähnelt einer auf der Basis stehenden Pyramide. Diese Neuronen kommen in fast allen Rindenschichten vor. Der Hauptfortsatz dieser Zellen wird Apikaldendrit oder Spitzenfortsatz genannt und weist vom Zellkörper aus in Richtung der (pialen) Rindenoberfläche (in allen Abbildungen, wenn nicht anders erwähnt, also zum oberen Bildrand gerichtet). Vom unteren Bereich des Zelleibes entspringen die sogenannten Basaldendriten. Sie sind mehrfach angelegt und laufen entweder horizontal oder schräg nach unten (manchmal auch schräg nach oben; z.B. bei Zahnwalen) in tiefere (oder oberflächlichere) Rindenregionen.

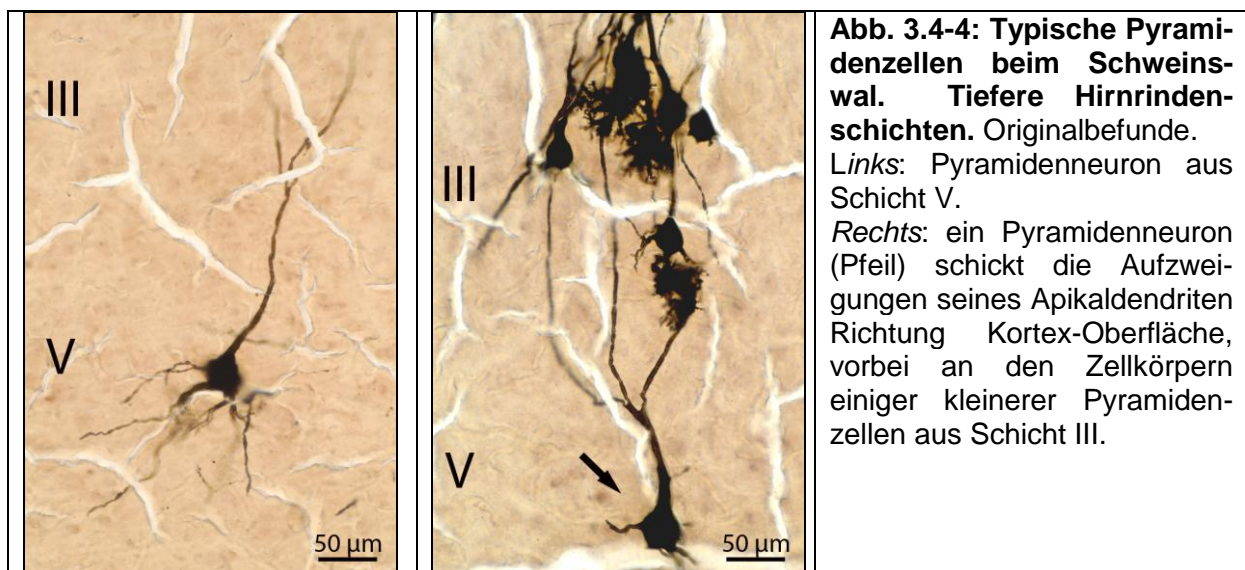
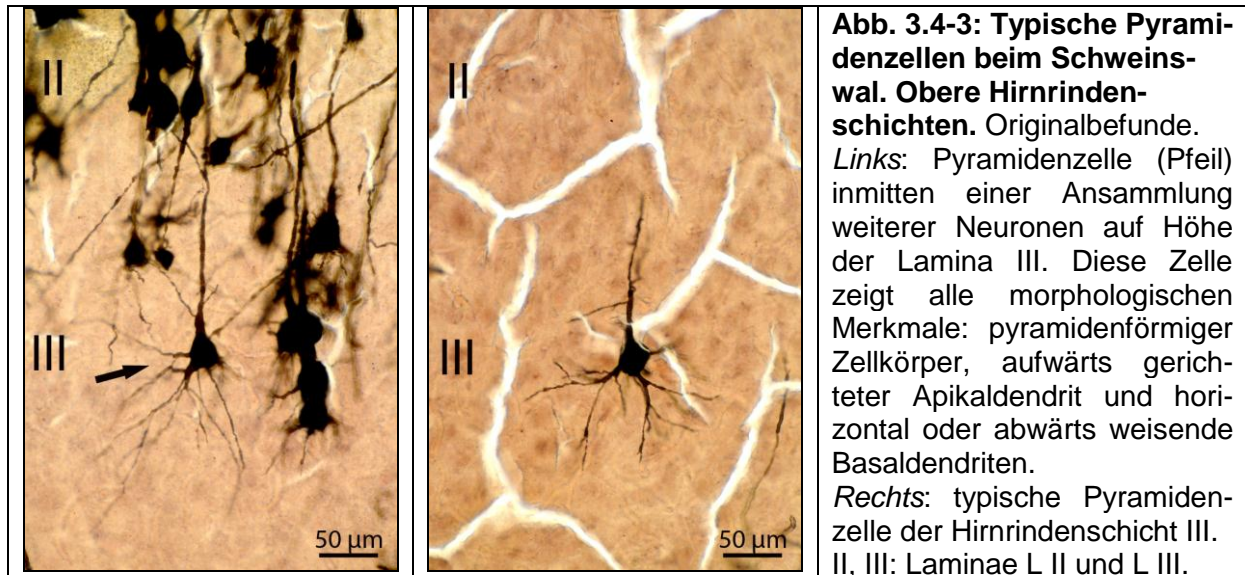
Das Axon der Pyramidenzelle entspringt meist an der Basis des Zellkörpers und zieht senkrecht in die weiße Substanz (in den Abbildungen also in Richtung Bildunterkante), in andere Kortex-Regionen, oder in subkortikale Zentren (s. Kap. 4.3.1.3). Der Informationsfluss kann somit unterschiedlich große Kortexareale umfassen bzw. in entfernte Zielregionen erfolgen. Wegen dieser charakteristischen Eigenschaft werden Pyramidenzellen auch typischerweise in der Gruppe der Projektionsneurone zusammengefasst.

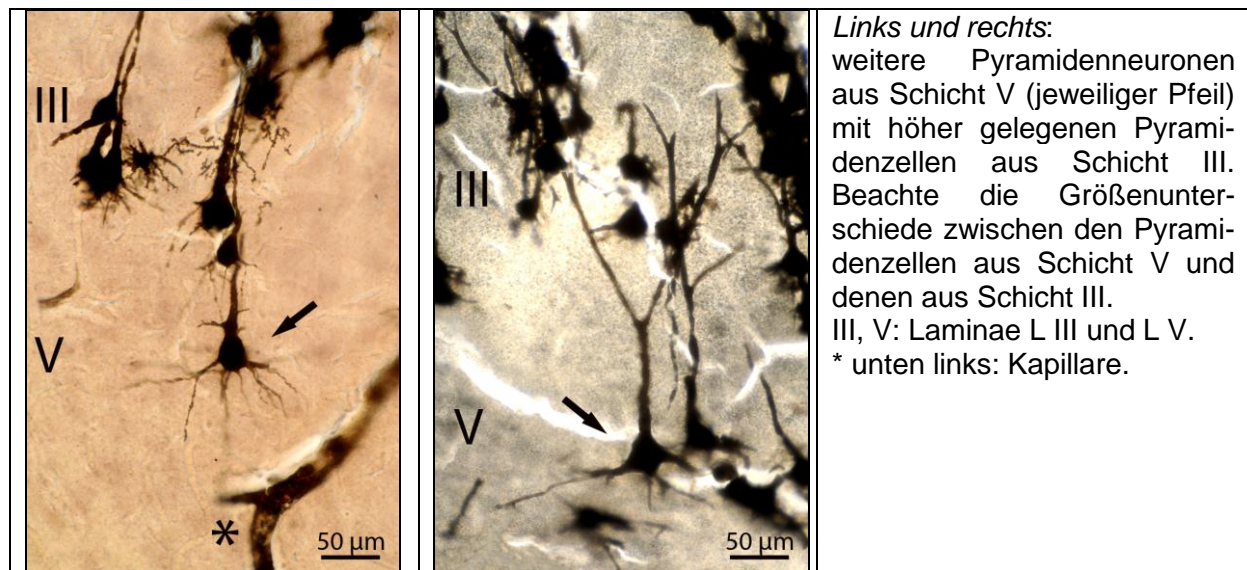
Aufgrund der Schwierigkeit, im Lichtmikroskop Axone von einzelnen Ästen der Dendriten zu unterscheiden und wegen einer teilweise unvollständigen Imprägnation wird im Folgenden auf die Beschriftung von Axonen größtenteils verzichtet.

Innerhalb der Pyramidenzellen werden je nach ihrer Form zwei Subtypen unterschieden: die typischen und die modifizierten Pyramidenzellen.



**Typische Pyramidenzellen** zeigen alle oben genannten Merkmale. Abbildungen 3.4-3 und 3.4-4 zeigen solche typischen Pyramidenzellen in höheren (vor allem Schicht III) und tieferen Kortex-Laminae (vor allem L V und L VI).



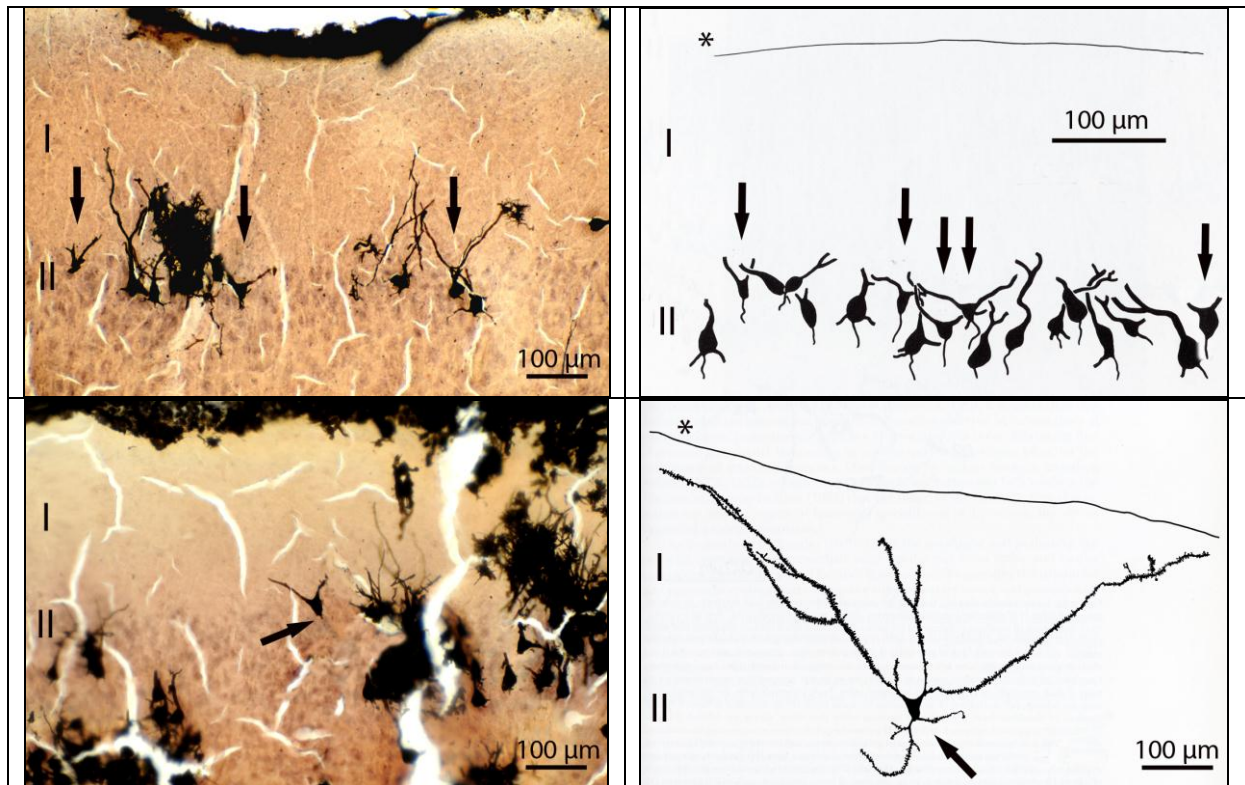


**Modifizierte Pyramidenzellen** hingegen zeigen zwar immer noch grundlegende Merkmale von Pyramidenzellen, weisen jedoch auch mehr oder minder stark ausgeprägte Abweichungen vom Bild einer typischen Pyramidenzelle auf.

Im Kortex des Schweinswals lassen sich aus der Gruppe der modifizierten Pyramidenzellen folgende zwei Zelltypen beschreiben: extravertierte Neuronen (extraverted neurons) und umgedrehte Pyramidenzellen (inverted pyramidal cells).

Die **extravertierten Neuronen** zeichnen sich folgendermaßen aus: 1) befinden sie sich in Lamina II; 2) besitzen sie einen meist dreieckig geformten Zellleib; 3) sind ihre Basaldendriten spärlich ausgeprägt; und 4) ragen ihre doppelt angelegten Apikaldendriten gabelartig bis in Schicht I auf. Die Anordnung der Dendriten dieses Zelltyps zeigt also eine klare Präferenz in Richtung der äußersten Kortex-Schicht L I (Molekularis). Das Axon der extravertierten Neuronen entspringt am Unterrand des Somas und zieht in Richtung der weißen Substanz.

Abbildung 3.4-5 zeigt Beispiele für extravertierte Neuronen in der Hirnrinde des Schweinswals.



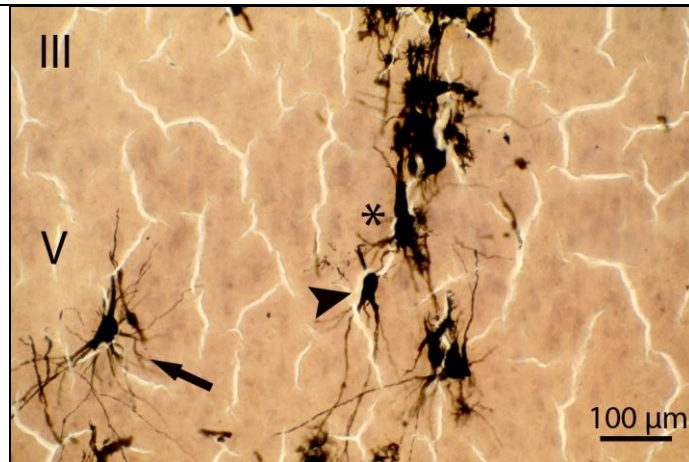
**Abb. 3.4-5: Beispiele für extravertierte Neuronen in der Großhirnrinde des Schweinswals.**

*Oben links:* extravertierte Neuronen (senkrechte Pfeile) in Schicht II des Schweinswal-Kortex. *Oben rechts:* Camera lucida- Zeichnung einer Gruppe extravertierter Neuronen (senkrechte Pfeile) in Höhe von L II. Man beachte die markante Zweiteilung des Dendriten und das Aufragen der Dendritengabel vom Oberrand des Zelleibes in Schicht L I hinein. *Unten links:* von einem extravertierten Neuron in Schicht L II des Schweinswal-Kortex entspringt am unteren Rand des dreieckigen Somas das Axon (Pfeil) und zieht in Richtung der weißen Substanz. *Unten rechts:* detaillierte Darstellung eines extravertierten Neurons (Camera lucida). Die am Soma entspringenden und meist schräg in Richtung Schicht L I ziehenden apikalen Dendriten sind deutlich stärker entwickelt als die basal entspringenden Dendriten, welche horizontal oder in tiefere Regionen ziehen (Pfeil). Beide Camera lucida-Darstellungen zeigen die Situation beim Großen Tümmler und sind modifiziert nach Morgane et al. (1990).

I-II: Kortexschichten L I und L II, \*: Oberflächliche Kortexbegrenzung in Form der Pia mater.

Die **invertierten Neuronen** hingegen ähneln morphologisch den typischen Pyramidenzellen. Der einzige Unterschied besteht darin, dass sie im Vergleich zu den letzteren umgedreht im Kortex liegen. Ihr pyramidenartiges Soma ist meist in den tieferen Kortexschichten L V und L VI gelegen, steht aber (auf die Kortex-Oberfläche bezogen) scheinbar auf dem Kopf, ist also invertiert. Folglich zeigt der Apikaldendrit der Zelle in Richtung der weißen Substanz und die Basaldendriten laufen aufwärtsgerichtet in höhere Kortexschichten. Das Axon entspringt an der Unterseite des Somas und läuft wie bei typischen Pyramidenzellen in Richtung der weißen Substanz. Abbildung 3.4-6 zeigt ein invertiertes Neuron neben einem typischen Pyramidenneuron.





**Abb. 3.4-6: Beispiel für ein invertiertes Neuron in Kortexschicht L V des Schweinswals.**

Die Abbildung zeigt ein invertiertes, also umgedrehtes Neuron (Pfeil) in Schicht L V im Vergleich zu einem typischen Pyramidenneuron (\*) und einer Doppelbuschzelle (Pfeilspitze) in derselben Schicht. Beim invertierten Neuron zeigt der Apikaldendrit unter  $45^\circ$  in Richtung Album und die Basaldendriten laufen in Richtung der Kortex-Oberfläche (im Bild oben). Morphologisch gesehen entspricht dieser Zelltyp also einem auf dem Kopf stehenden typischen Pyramidenneuron.

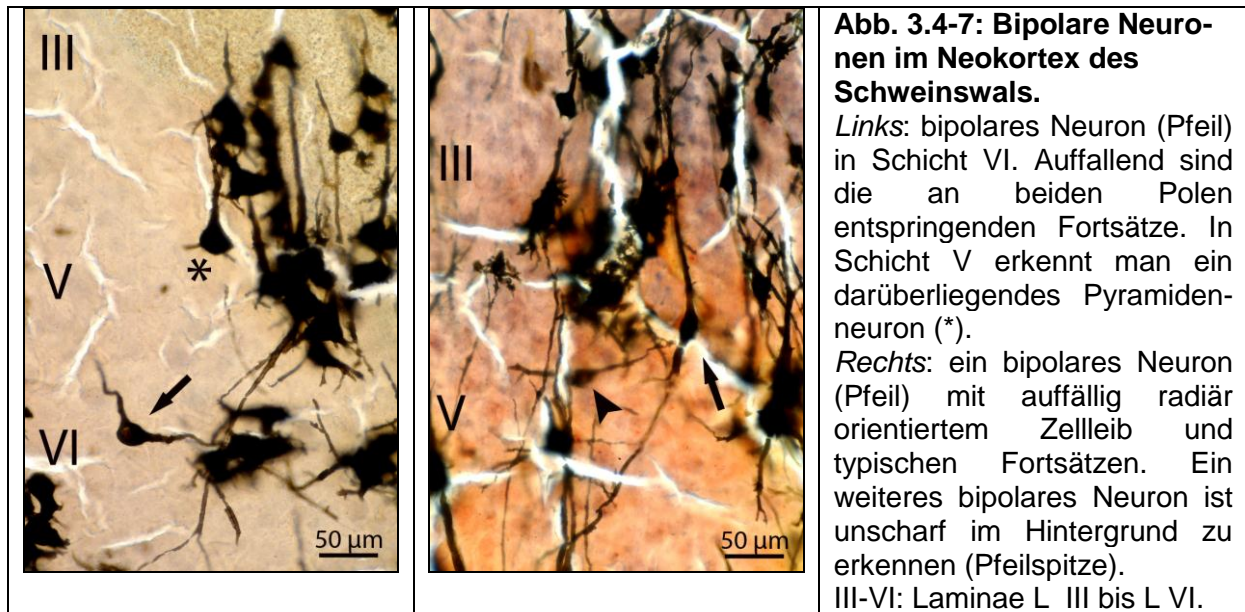
III, V: Hirnrindenschichten III und V.

### 3.4.2 Nicht-Pyramidenzellen

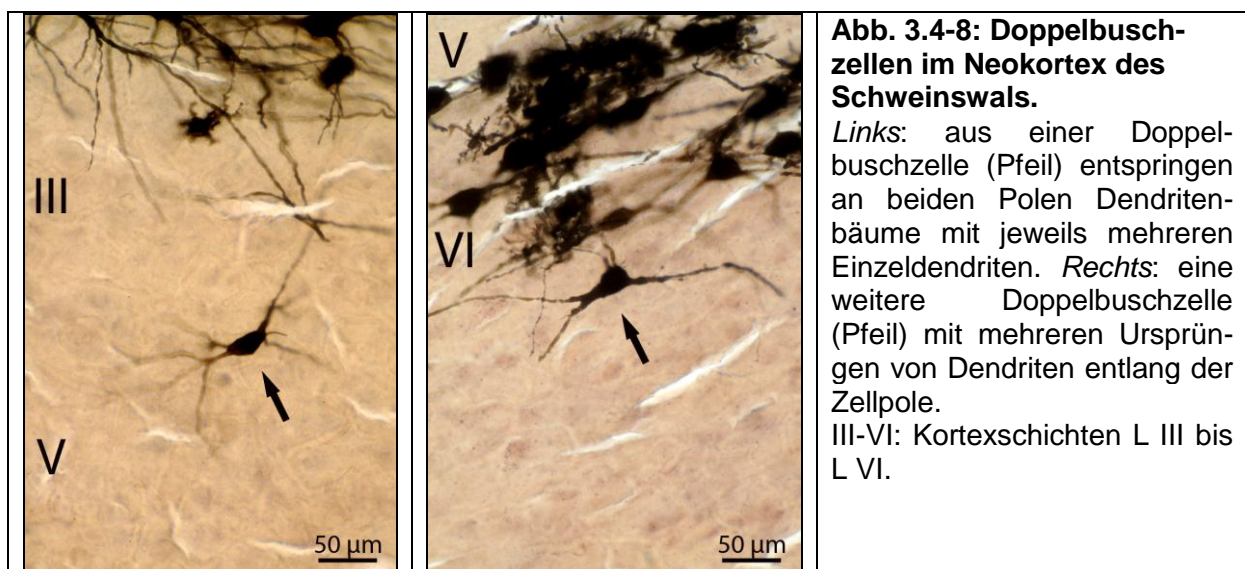
Einige Neuronen in der Hirnrinde weichen in morphologischer Hinsicht gravierend vom pyramidenartigen Zell-Typ ab und werden deshalb in einer eigenen Klasse zusammengefasst: den Nicht-Pyramidenzellen.

Ihre Zellkörper können stark variieren, sind jedoch nicht pyramidenförmig. Auch fehlt diesen Zellen ein markanter Apikaldendrit. Da das Axon im Gegensatz zur Situation bei Pyramidenzellen die Großhirnrinde nicht verlässt, dienen diese Neuronen der intrinsischen Verschaltung innerhalb des Kortex. Deshalb werden diese Nicht-Pyramidenzellen – im Gegensatz zu Pyramidenzellen als Projektionsneuronen - in der Gruppe der Interneuronen zusammengefasst. Einige ausgewählte Vertreter dieser Zell-Klasse werden mit Blick auf die im Kapitel 3.4 einleitend gegebene Synopsis (vgl. Abb. 3.4-1) im Folgenden genauer betrachtet.

**Bipolare Neuronen** besitzen schlanke, radiär ausgerichtete Zellleiber. Die Dendriten entspringen an beiden Zell-Polen und ziehen in entgegengesetzte Richtungen. Dieser Zelltyp kann in allen Laminae vorkommen. Abbildung 3.4-7 zeigt zwei Beispiele für bipolare Neuronen beim Schweinswal.

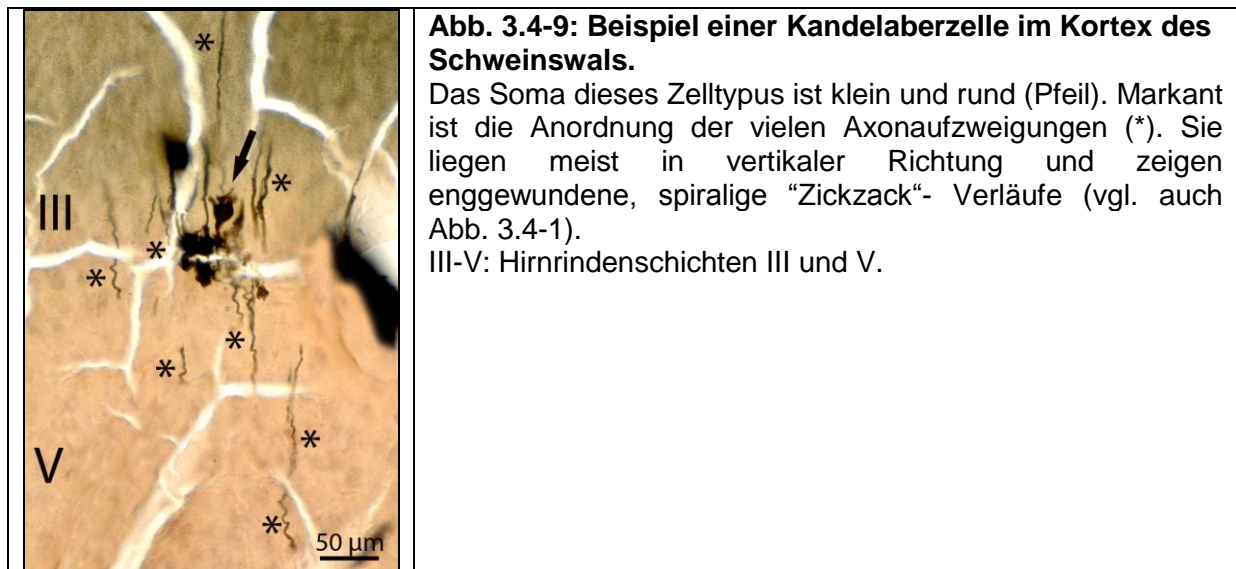


**Doppelbuschzellen** („double bouquet cells“) besitzen schlanke Zellkörper und zwei, jeweils an den Polen entspringende Dendritenbäume. Anders als bei bipolaren Neuronen entspringen aus diesen Dendritenbäumen mehrere Dendritenfortsätze. Dieser Neuronentypus kann in allen Schichten auftreten. Abbildung 3.4-8 zeigt Beispiele für Doppelbuschzellen in der Großhirnrinde beim Schweinswal.

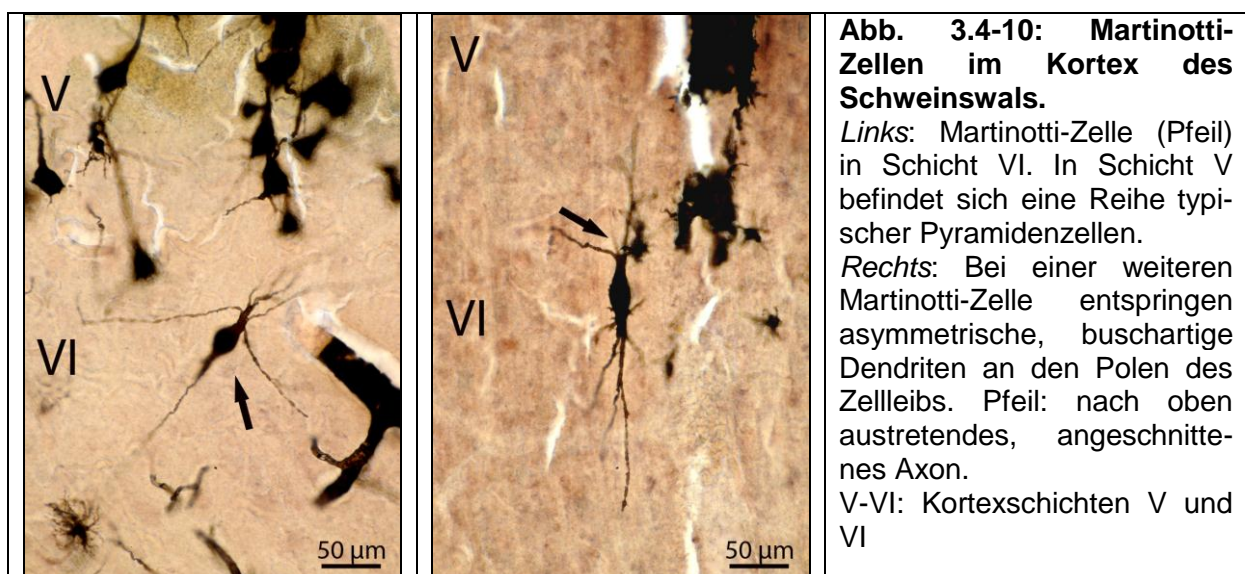


**Kandelaberzellen** („chandelier cells“) besitzen neben einem kleinen runden Zelleib ein markantes Merkmal: das Axon dieser Neuronen besitzt eine Vielzahl von Aufzweigungen, die samt ihren Auftreibungen jeweils an einzelne Kerzen erinnern (vgl. Abb. 3.4-1). In ihrer Gesamtheit entsteht so das Bild eines mit Kerzen bestückten Kandelabers (Armleuchters). Diese Zellen treten vor allem in den

Laminae L II und L III auf. In Abbildung 3.4-9 wird eine typische Kandelaberzelle beim Schweinswal gezeigt.

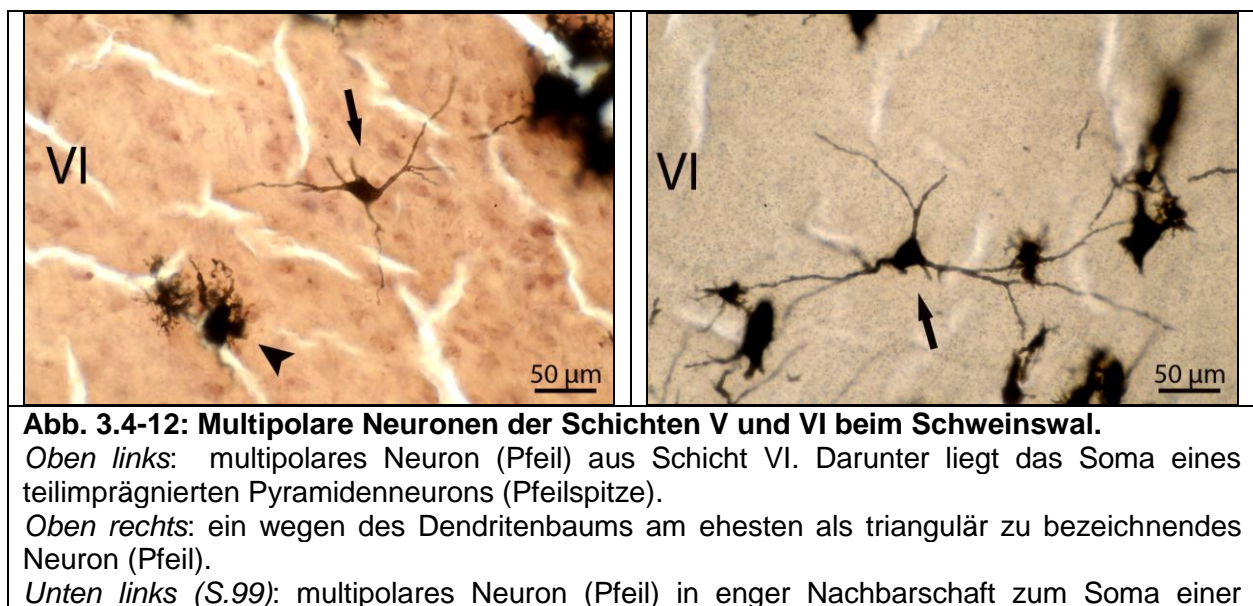
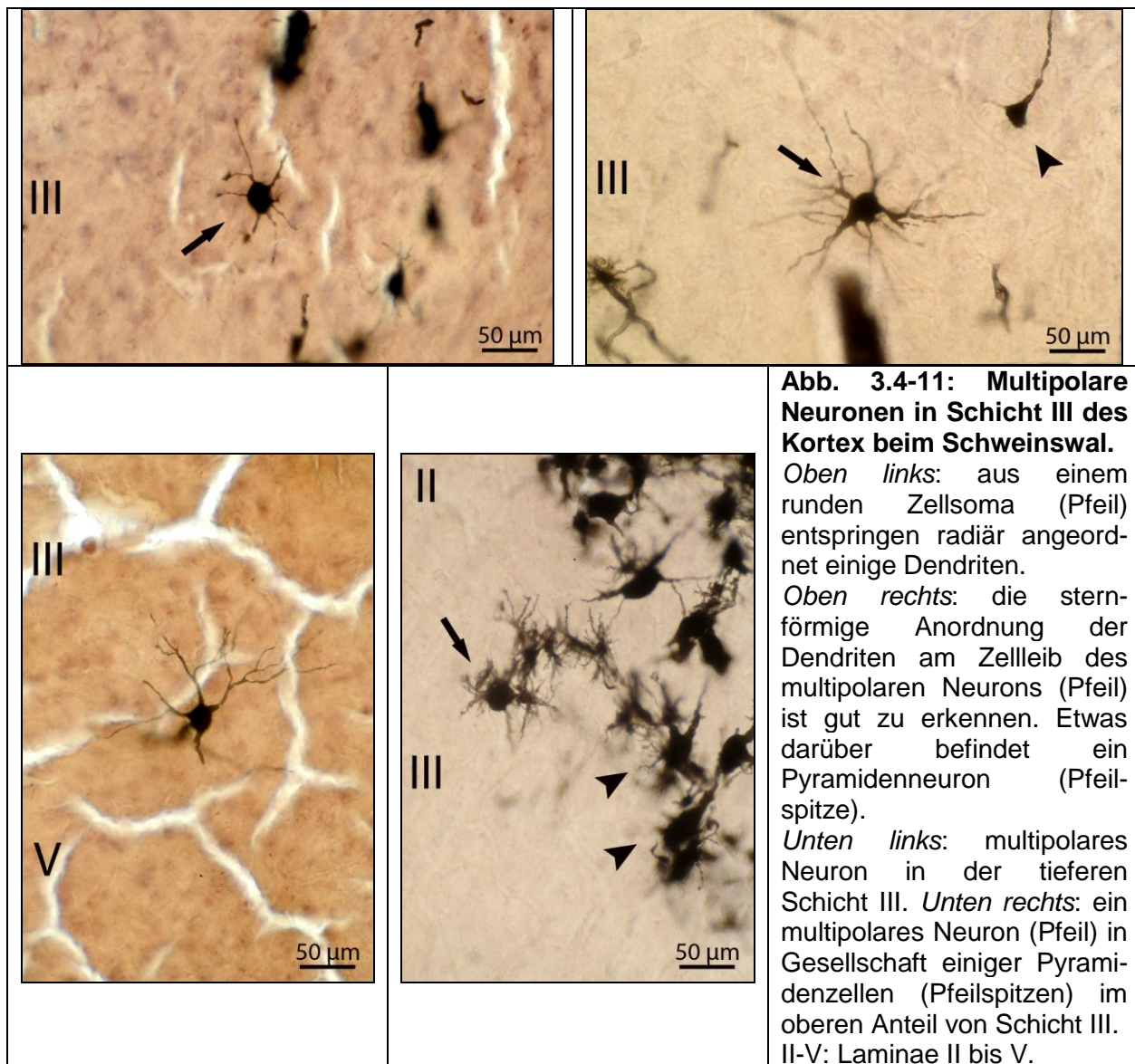


**Martinotti-Zellen** zeichnen sich vor allem durch zwei Merkmale aus: ihre Lage in Schicht VI (oder in der Tiefe von Schicht V) und ihr charakteristisches bipolares Zellsoma mit mehreren buschartigen Dendritenabgängen, die von beiden Polen oft asymmetrisch entspringen. Das Axon dieses Neuronentyps steigt bis in Schicht I auf, wo es horizontal verlaufende Geflechte (Plexus) bildet (vgl. Abb. 3.4-1). Beispiele für Martinotti-Zellen in Schicht VI im Kortex des Schweinswals zeigt Abbildung 3.4-10.



**Multipolare Neuronen** kommen vor allem in den Neokortex-Schichten III und V vor. Das Zellsoma ist meist rund und kann unterschiedlich groß sein (kleine, mittelgroße und große Formen). Die Dendriten entspringen sternförmig vom Soma und ziehen radiär in alle Richtungen (Abb. 3.4-1), wobei manchmal einzelne Dendriten besonders ausgeprägt erscheinen können. Deshalb werden diese Zellen je nach Dendritenverlauf tri- bzw. multianguläre Zellen oder auch Sternzellen (stellate cells) genannt. Die Axone der Neuronen (in der vorgelegten Untersuchung nur selten erkennbar) nehmen laut Literatur säugerübergreifend mitunter einen charakteristischen Verlauf. Unmittelbar nach seinem Austritt gibt das Axon einige Kollaterale ab, die ihrerseits korbähnlich den Zelleib einer Pyramidenzelle umrahmen (Valverde und López-Mascaraque 1981; Valverde 1983; Valverde et al. 1986; Valverde und Facal-Valverde 1986; Nieuwenhuys 1994, 1998). Dann wird dieser multipolare Zelltyp auch als Korbzelle (basket cell) bezeichnet (vgl. Abb. 3.4-1). Beispiele für multipolare Neuronen in höheren (vor allem Schicht III) und tieferen Kortexschichten (vor allem L V und L VI) beim Schweinswal zeigen die Abbildungen 3.4-11 und 3.4-12.

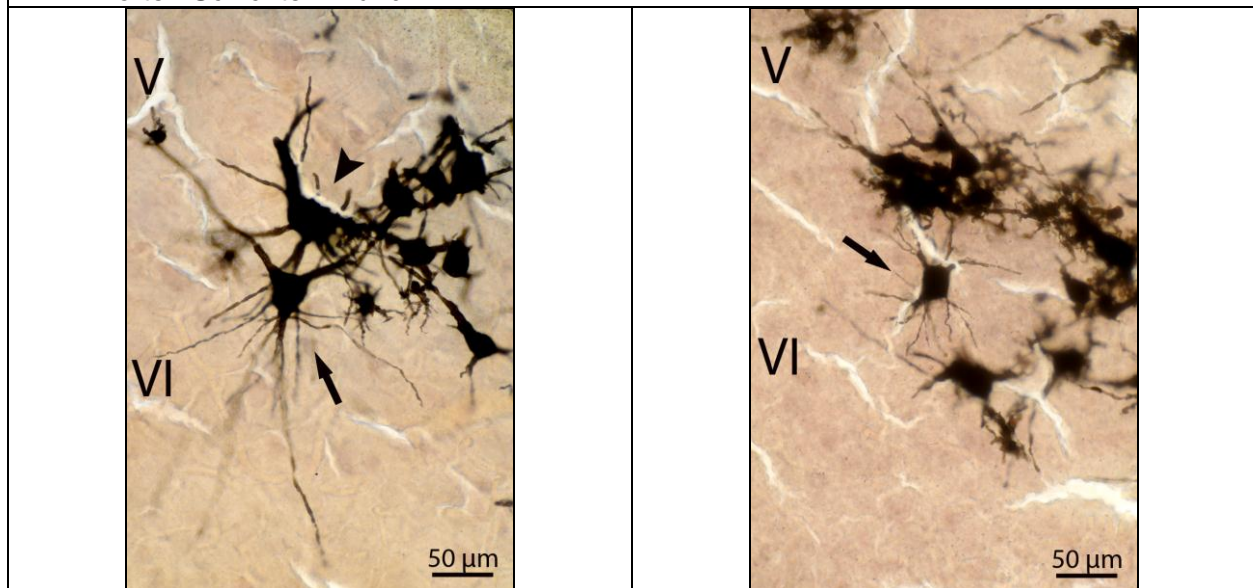




großen Lamina V-Pyramidenzelle (Pfeilspitze). Beachte die vergleichbar großen Perikarya beider Zellen.

*Unten rechts:* kleineres multipolares Neuron (Pfeil) neben kleinerer Pyramidenzelle (rechts daneben).

V-VI: Kortex-Schichten V und VI.



### 3.5 Immunhistochemische Analyse der primären Rindenfelder bei Spezies von Zahnwalen, Huftieren, einem Raubtier und Primaten

Im folgenden Abschnitt wird die immunhistochemische Untersuchung bestimmter Kortexareale bei einzelnen, ausgewählten Säugetieren dargelegt. Es handelt sich hierbei um die Areale M1, S1, A1 und V1 bei zwei Zahnwalen (Schweinswal und Großer Tümmler), zwei Huftieren (Schwein und Schaf), einem Raubtier (Hund) und zwei Primaten (Gorilla und Mensch). Hierbei werden 60 µm dick geschnittene Proben untersucht. Zum Einsatz kommen neben Antikörpern gegen die Calcium-bindenden Proteine Calbindin, Calretinin und Parvalbumin auch ein Antikörper gegen das Strukturprotein Neurofilament. Genauer zum Hintergrund der Probenbehandlung und der hier verwendeten Antikörper findet sich in Kap. 2.3.5.

Zur Illustration der Ergebnisse werden durchweg Abbildungen gezeigt, die repräsentativ-validen Charakter besitzen und eine kortikale Region samt deren immunhistochemischer Färbung als „pars pro toto“ verlässlich wiedergeben.

Hierbei sind die als Tafeln montierten Darstellungen im gesamten Kap. 3.5 stets nach folgendem Schema aufgebaut: von links nach rechts sind die vier Hirnrindenareale M1, S1, A1 und V1 angeordnet. Ferner besteht ein einzelnes Areal in den Abbildungen aus jeweils zwei Komponenten: links dem etwas schmaleren Detail

eines Nissl-gefärbten Schnitts und rechts dem etwas breiteren Detail eines ihm benachbarten, immunhistochemisch gefärbten Schnitts. An Beschriftung für jedes Areal finden sich im Nissl-Bild die Abkürzungen für die Laminae I bis VI (I-VI) und der Name des betreffenden Areals (M1, S1, A1 oder V1). Auf diese Weise soll das Nissl-Übersichtsbild (links) dem Betrachter eine optimale Orientierung im immunhistochemisch gefärbten Schnitt (rechts) ermöglichen.

### **3.5.1 Anti-Calbindin**

Bei Verwendung des Antikörpers gegen das Calcium-bindende Protein Calbindin (CB) zeigen die verschiedenen Spezies unterschiedliche Ergebnisse.

#### **Schweinswal:**

Die Verwendung dieses Antikörpers zeigt für die Kortexareale des Schweinwals auch bei strikter Einhaltung des Labor- Protokolls und ihrer immunhistochemischen Bearbeitung parallel zu anderen Kortizes (mit positiver Immun-Reaktion, IR) keine spezifische Färbung.

#### **Großer Tümmler:**

Auch beim Großen Tümmler führt die Verwendung des Antikörpers Anti-Calbindin zu keiner spezifischen Färbung.

#### **Schwein:**

Die Hirnrindenareale des Schweins zeigen dagegen eine deutliche Immunreaktivität gegen Anti-Calbindin (siehe Abb. 3.5-1), wobei deren Intensität in allen Arealen ungefähr gleich stark zu sein scheint.

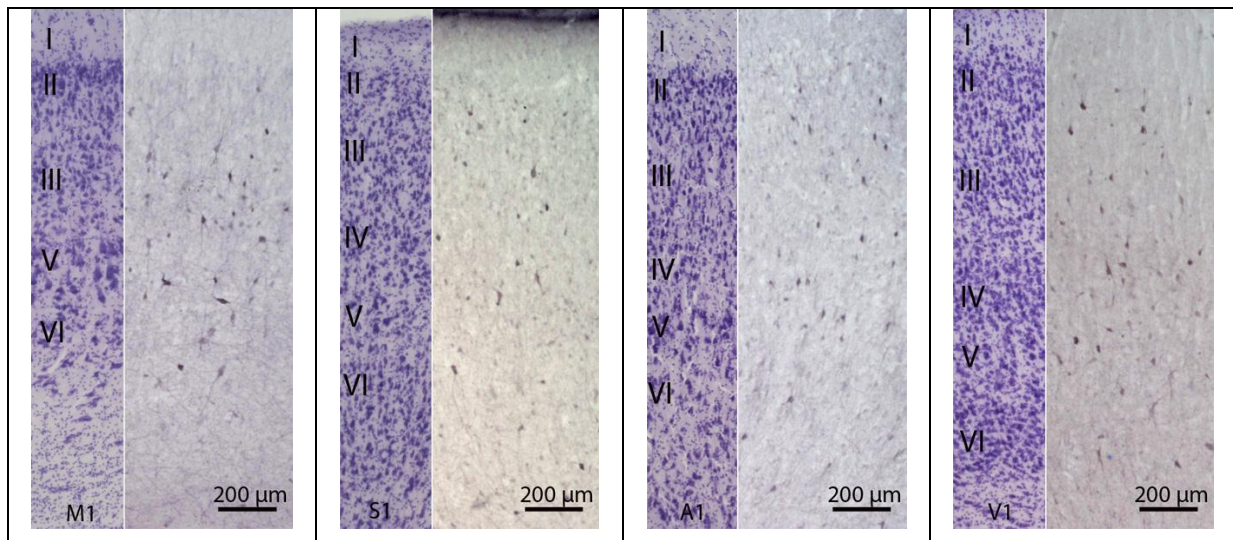
Im **Areal M1** sind die immunreaktiven Zellen (CB+- Zellen) vornehmlich in den tieferen Schichten III bis VI lokalisiert. Neben relativ vielen kleinen Zellen sind auch einige größere Neuronen gefärbt (vor allem in der unteren Schicht III und in Schicht V). Dagegen scheinen die Schichten I und II so gut wie frei von CB+-Immunreaktivität (CB+ IR).

Im **Areal S1** finden sich immunreaktive (ir) Zellen in fast allen Schichten. Lediglich Schicht I scheint auch hier frei von Calbindin. Neben kleinen Zellen gibt es einige größere CB+-Zellen, vor allem in den Schichten III und V.

Ein ähnliches Bild zeigt das **Areal A1**: Schicht I enthält kaum gelabelte Zellen und die darunterliegenden Schichten II bis VI weisen kleine bis mittelgroße CB+-Neuronen auf, die relativ gleichmäßig verteilt liegen.



In **Areal V1** sind CB+- Zellen über alle sechs Rindenschichten hinweg verteilt, wobei Schicht I auch hier nur vereinzelt gefärbte Neuronen enthält. Die deutlich markierten Zellen liegen homogen über die Schichten L III bis L VI verteilt, mit einem etwas stärker gefärbten Anteil größerer Zellen in den Randbereichen von L III und der Mitte von L V.



**Abb. 3.5-1: Anti-Calbindin- positive Zellen (CB+- Zellen) in der Hirnrinde des Schweins.**

In allen vier Arealen (M1, S1, A1 und V1) liegen die gefärbten Neuronen über die Laminae III bis VI relativ gleichmäßig verteilt. Einzige Neuronen aus Schicht I scheinen nur schwach (in A1 und V1) bis gar nicht (in M1 und S1) gelabelt. In den pyramidalen Schichten III und V liegen vereinzelt relativ große CB+- Zellen.

### **Schaf:**

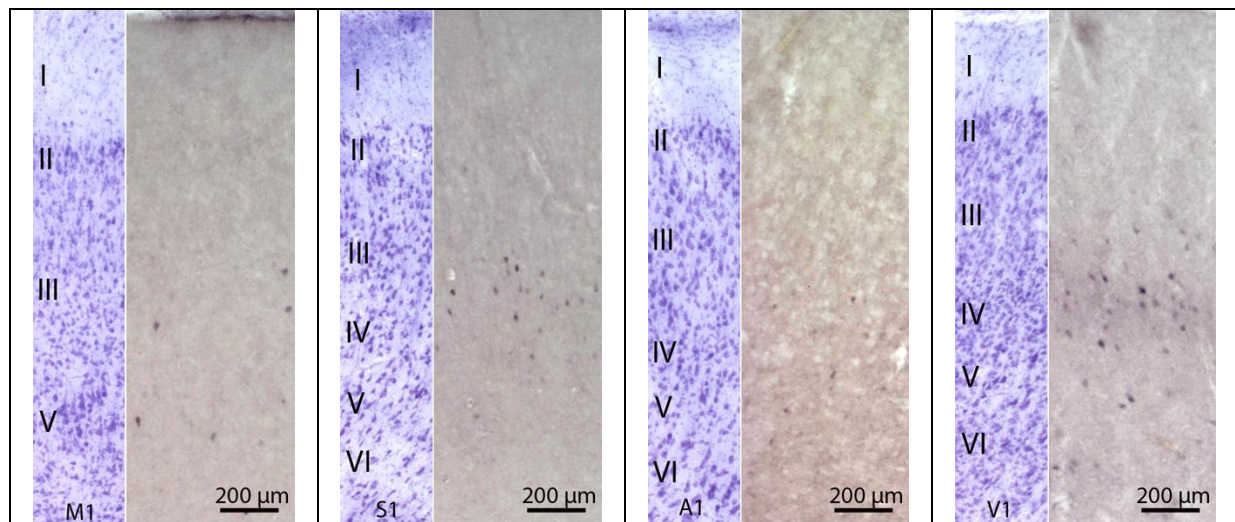
Beim Schaf ist die Immunreaktivität (IR) insgesamt etwas schwächer als beim Schwein (simultane Parallel-Prozessierung der Schnitte nach demselben Protokoll): Innerhalb der verschiedenen Kortizes (vgl. Abbildung 3.5-2) scheint die IR in S1 und V1 am deutlichsten ausgeprägt. L I ist beim Schaf wie auch beim Schwein frei von Labeling.

**Areal M1** zeigt nur einige wenige immunreaktive (ir) Neuronen in den Schichten III und V. Die restlichen Laminae sind dagegen frei von CB+- Zellen.

Das **Areal S1** enthält ir-Neuronen nahezu ausschließlich im mittleren Abschnitt von Schicht III. Lediglich einige wenige ir-Neuronen sind in L IV und L V zu erkennen. L I, II und VI dagegen enthalten keine CB+- Zellen.

In **Areal A1** erscheinen die ir-Zellen in den Laminae III, IV und V. L I, II und VI scheinen auch hier frei von immunpositiven Neuronen.

Das visuelle **Areal V1** zeigt CB-ir Neuronen in den tiefen Anteilen von L III und vor allem in der ganzen Breite von L IV. Zusätzlich sind auch in Schicht V einzelne gefärbte Neuronen vorhanden. Unter den überwiegend kleinen Zellen finden sich auch einige größere Somata vor allem in den Randbereichen der Schicht IV.



**Abb. 3.5-2: Anti-Calbindin- positive Zellen im Kortex des Schafs.**

Die ir-Zellen liegen bei diesem Tier in allen Kortex-Arealen vor allem in den mittleren Schichten L III und L IV (in S1, A1 und V1) und in L V. In M1 und V1 scheinen manche CB+Zellen größer zu sein als die sonst relativ kleinen Zellen in der Nachbarschaft.

### Hund:

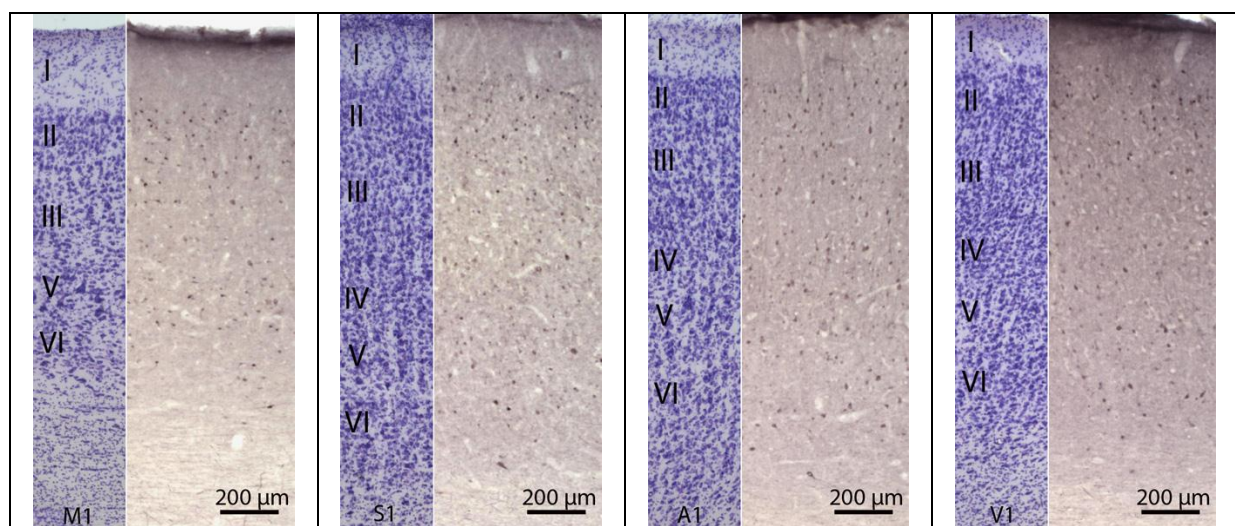
Bei diesem Tier zeigt das labeling mit anti-Calbindin innerhalb der Kortexes eine relativ gleichmäßige Verteilung (vgl. Abb. 3.5-3) und ist insgesamt deutlich stärker als beim Schaf. Im Vergleich mit dem Schwein ist die IR beim Hund zwar ähnlich generalisiert, aber deutlich ‚kleinteiliger‘, umfasst also tendenziell kleinere Neuronen. L I ist fast frei von IR; die Kortexes A1 und V1 weisen hier eine geringe Immunreaktivität auf, doch handelt es sich dabei vielleicht auch um dislozierte Neuronen von L II. In L II scheint die IR generell etwas höher zu sein als in den übrigen Schichten.

Beim motorischen **Areal M1** des Hundes liegen die CB+- Zellen vor allem in L II, der oberen Zone von L III und der gesamten Breite von Schicht V. Auch in Schicht VI liegen vereinzelt gelabelte Neuronen. Dagegen scheinen die tieferen Anteile der L III relativ frei von CB-ir-Zellen. L I ist völlig ohne IR.

Das somatosensible **Areal S1** zeigt mit Ausnahme von L I eine relativ gleichmäßige Verteilung der CB+- Zellen. Vor allem die oberen Anteile von L III und die tieferen Anteile von L IV samt der benachbarten Schicht V sind relativ reich an markierten

Neuronen. Vereinzelt erkennt man auch etwas größere Zellkaliber, vor allem in L III und L V.

Das auditorische **Areal A1** bietet ebenfalls ein ziemlich homogenes Reaktivitätsmuster. Auch hier erkennt man CB+- Zellen über alle Hirnrindenschichten hinweg. Vor allem die Schichten II und III (oberer Anteil) sowie L IV und L V (oberer Anteil) wirken etwas stärker markiert. In der Tiefe von L III und am Oberrand von L V erkennt man vereinzelt größere Zellkörper von CB+- Neuronen, desgleichen in L VI. Auch das visuelle **Areal V1** zeigt ein vergleichbares Bild. In allen sechs Kortexschichten finden sich CB+- Zellen. Jedoch sind diese in L I auf die unterste Zone beschränkt. In den übrigen Schichten dagegen liegen die Zellen meist gleichmäßig verteilt, wobei stärker markierte Regionen vor allem in L II, den mittleren Anteilen von L III und in den tieferen Anteilen von Schicht V und VI vorliegen.



**Abb. 3.5-3: Anti-Calbindin gefärbte Zellen im Kortex des Hundes.**

Die in allen Arealen relativ homogen verteilten CB+- Zellen sind in L II, den oberen Anteilen von L III und den tieferen Anteilen von L V und L VI etwas häufiger. Zwischen den relativ kleinen Neuronen liegen auch vereinzelt eingestreute größere Zellen (vor allem in L III und L V).

### **Gorilla:**

Das Labeling der Kortizes des Gorillas mit anti-Calbindin zeigt arealspezifische Eigenheiten (siehe Abb. 3.5-4) bei einer allgemeinen leichten Präferenz für die oberen Schichten II und III. Insgesamt gesehen ist die IR deutlich ausgeprägter als beim Schwein, dem Hund und erst recht beim Schaf. Ungewöhnlich ist die Teildarstellung von Zellfortsätzen vor allem in M1. In den verschiedenen Kortizes des

Gorillas ist L I Calbindin-frei, während L II als Schicht zumindest angedeutet ist, am stärksten in S1 und A1 und am schwächsten in V1.

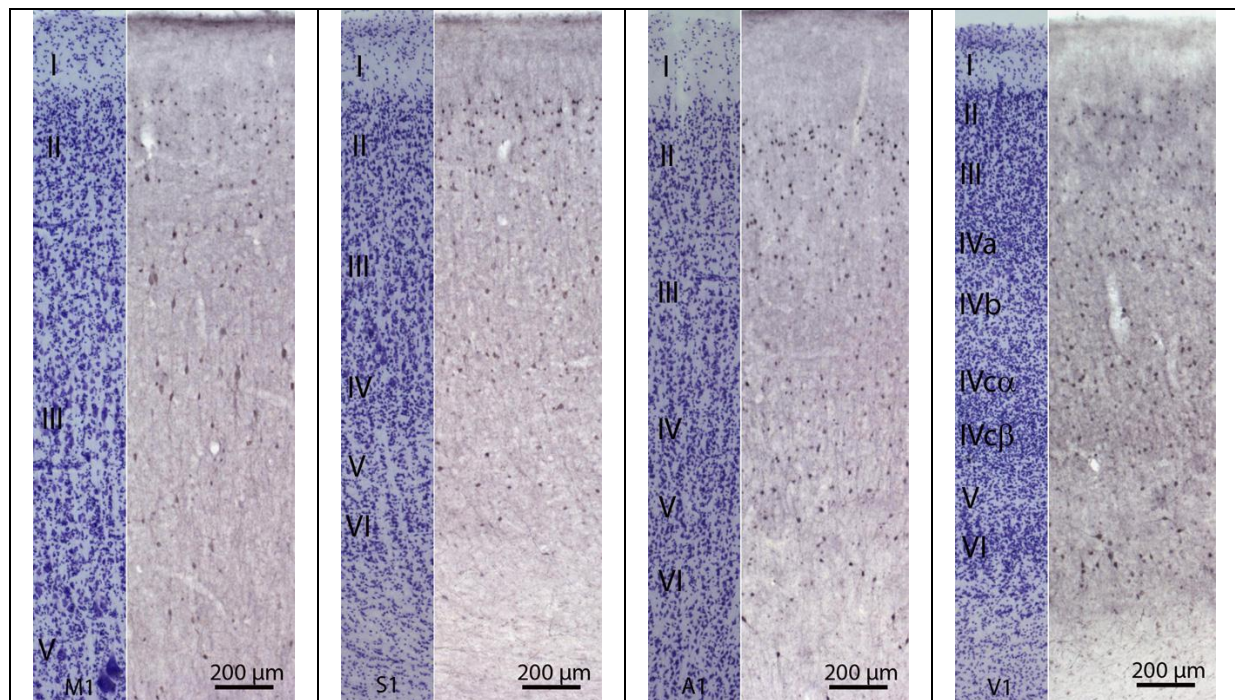
Im **Areal M1** zeigen sich die CB+ -Zellen besonders deutlich in L II und den oberen Anteilen von L III; wobei letztere die größten Perikarya beinhaltet. Am Übergang von L III zu L V wirkt die Dichte von CB+ -Zellen herabgesetzt (man beachte hierbei das Fehlen der L VI in M1 im Zusammenhang mit der Wahrung eines einheitlichen Maßstabs für den korrekten [1:1] Vergleich der Abbildungen). In den oberen Regionen von L III finden sich vereinzelt eingestreute größere Kaliber von CB+ -Neuronen.

Im **Areal S1** sind die markierten Perikarya ebenfalls vor allem in den oberen Zonen von L II und in L III präsent. Allerdings liegen einige CB+ -Zellen auch in den tiefen Regionen von L III und in L V. Der mittlere Anteil von L III sowie der tiefere Anteil von L IV dagegen wirken relativ frei von CB+ -Neuronen.

Das auditorische **Areal A1** zeigt ein ähnliches Bild wie S1. Relativ viele CB+ -Zellen finden sich in L II, in den hohen und tiefen Grenzregionen von L III, den mittleren Anteilen der L IV und der gesamten Breite von L V. Dagegen wirken die mittleren Bereiche von L III, die oberen Teile von L IV und L VI relativ dünn mit CB+ -Neuronen besiedelt.

In **Areal V1** sind CB+ -Neuronen (mit Ausnahme von L I) in allen Laminae vorhanden. Allerdings scheinen die mittlere L III, L IVb und L V im Vergleich zu den umliegenden Schichten am wenigsten CB+ -Zellen zu enthalten. Dagegen wirken L IVa, L IVc $\alpha$ , L IVc $\beta$  und L VI besonders reich an markierten Zellen. In IVc $\beta$  sind hier sehr kleine Zellen erkennbar, was gut mit dem Nissl-Bild korrespondiert. Dagegen sind in L VI dieses Areals teilweise verhältnismäßig große Perikarya lokalisiert.





**Abb. 3.5-4: Anti-Calbindin- markierte Neuronen im Kortex des Gorillas.**

In allen Arealen scheinen CB+-Perikarya relativ weitläufig verteilt. In der mehrfach unterteilten L IV des Areals V1 enthalten die Sublaminae IVa und IVc $\alpha$  relativ viele CB+ -ir Neuronen während Sublamina IVc $\beta$  sehr kleine CB+ -Somata beherbergt.

### **Mensch:**

Bei Behandlung der Hirnrindenareale M1, S1, A1 und V1 mit dem Antikörper Anti-Calbindin zeigen sich folgende Auffälligkeiten (vgl. Abb. 3.5-5):

Die Unterschiede zwischen Mensch und Gorilla sind eher gering. So ist L I beim Menschen wie beim Gorilla frei von Calbindin-Markierung. Die Laminae II- VI sind beim Menschen teilweise etwas weniger gleichförmig gelabelt, wobei hier die Immunreaktivität in S1 und V1 tendenziell etwas mehr auf die oberen Laminae II-IV beschränkt ist.

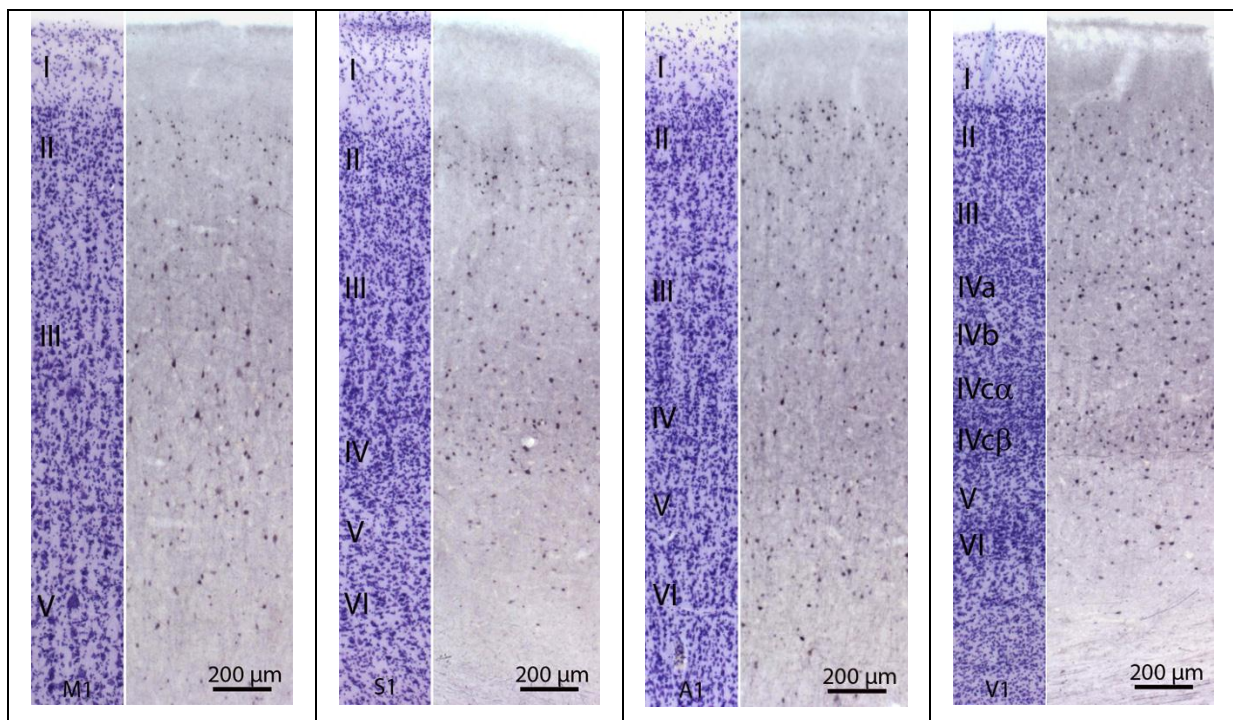
In **Areal M1** sind beim Menschen vor allem L II und L III besonders reich an CB+ -Zellen. Im oberen und mittleren Abschnitt von L III sind einige dieser Zellen deutlich magnozellular. Auch L V enthält vereinzelt CB+ -Zellen (man beachte das Fehlen von L VI in M1 im Zusammenhang mit der Wahrung eines einheitlichen Maßstabs für den korrekten Vergleich der Abbildungen; Fotografieren mit gleichem Objektiv wie in S1, A1 und V1). Die Betzschen Riesenpyramidenzellen (jeweils links unten in M1) sind bei beiden Spezies nicht gelabelt.

In **Areal S1** findet sich eine Vielzahl gelabelter Zellen in L II und L III, wobei in L III hierfür besonders die tiefen Anteile am Übergang zu L IV imponieren. L IV ihrerseits

enthält vor allem in der oberen Hälfte dicht gepackte CB+ -Zellen. L V und insbesondere L VI enthalten dagegen nur relativ wenige markierte Neuronen.

Das **Areal A1** enthält in den Schichten II- VI eine Vielzahl markierter Neuronen. All diese Schichten wirken dabei relativ ähnlich dicht mit CB+ -Zellen besetzt. Ähnlich M1 finden sich größere Somata mehr oder minder regelhaft über die Laminae III-VI verstreut, erreichen aber nur kleinere Kaliber.

Im **Areal V1** zeigen vor allem die Schichten II, III und IV eine Menge markierter Zellen. In Schicht IV sind vor allem die Unterschichten IVa und IVc $\beta$  reich an kleinen CB+ -Neuronen. Wie in Areal A1 sind auch in V1 etwas größere Somata mehr oder minder über die Laminae III- VI verstreut. Die Schichten V und speziell VI dagegen erscheinen relativ zellarm wie in S1, enthalten aber einige größere Somata. Schicht I enthält bis auf ein paar wenige Ausnahmen am ihrem Unterrand keinerlei CB+ -Zellen.



**Abb. 3.5-5: Anti-Calbindin- positive Zellen in der Hirnrinde des Menschen.**

Mit Ausnahme von Schicht I scheinen CB+ - Zellen in allen Arealen relativ weitläufig verteilt. In der mehrfach unterteilten L IV des Areals V1 enthalten die Sublaminae IVa und IVc $\beta$  relativ viele CB+ -ir Neuronen während Sublamina IVc $\alpha$  relativ wenige CB+ -Somata beherbergt. Für Details s. Text.

### 3.5.2 Anti-Calretinin

Die Verwendung des Antikörpers gegen das Calcium-bindende Protein Calretinin (CR) brachte in den verschiedenen Spezies folgende Ergebnisse.

#### Schweinswal:

Anders als bei der Verwendung von Anti- Calbindin (s. oben), konnte mit Anti-Calretinin beim Schweinswal spezifische Immunreaktivität erzielt werden. Bei diesem Tier zeigt der Kortex ein arealübergreifendes Muster. In M1, S1, A1 und V1 sind die CR+ -Zellen (Somata) in ähnlicher Weise angeordnet (vgl. Abb. 3.5-6). Die Masse der markierten Perikarya befindet sich stets in L II und im oberen Streifen von L III. Wirklich große Somata (Pfeile) sind vereinzelt in L III und L V anzutreffen.

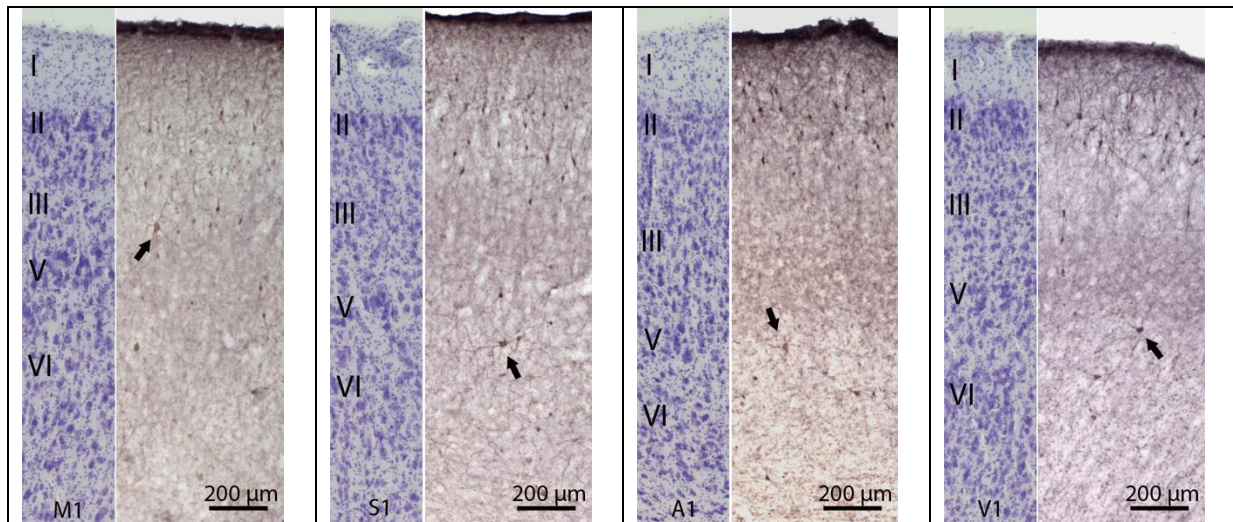
Im **Areal M1** sind CR+ -Zellen vor allem in L II und L III zu erkennen (vor allem im oberen Anteil), desgleichen in L V (vor allem im unteren Abschnitt). Die Schichten L I (am Unterrand) und L VI sind verhältnismäßig spärlich gelabelt. Die markierten Zellen sind meist vertikal orientiert. An den Übergängen von L III zu L V und von L V zu L VI finden sich einzelne große CR+ -Zellen, die multipolar erscheinen.

Ein ähnliches Bild zeigt sich im **Areal S1**: hier sind vor allem in den Schichten L II, III (oberer Anteil) und L V (tiefer Abschnitt) vertikal orientierte Zellen markiert. L I (am Unterrand), L III (im unteren Anteil) und L VI enthalten auch hier spärlich CR+ -Neuronen. In den tieferen Abschnitten von L III und L V finden sich auch hier einige wenige, großkalibrige multipolare CR+ -Zellen.

Auch im **Areal A1** sind CR+ -Zellen vor allem in den Schichten L II, III (oberer Anteil) und in zahlenmäßig geringem Maße in L V (unterer Anteil) enthalten. L I (am Übergang zu Schicht II) und L VI sind hingegen nur mit ein paar gelabelten Zellen ausgestattet. Auch hier finden sich am Übergang von L V zu L VI vereinzelt relativ große, multipolare CR+ -Neuronen.

Im **Areal V1** befinden sich markierte Zellen wiederum vor allem in den Schichten L II, III (oberer Abschnitt) und L V (unterer Abschnitt). Die Schichten L I (am Unterrand) und VI wirken spärlicher mit CR+ -Neuronen besetzt. Auch in diesem Areal finden sich am Übergang von L V zu L VI einige wenige, große und multipolare CR+ -Zellen.





**Abb. 3.5-6: Anti-Calretinin- markierte Zellen im Kortex des Schweinswals.**

Diese Gegenüberstellung zeigt ein arealübergreifendes Muster: die meist vertikal orientierten CR+ -Zellen finden sich gehäuft in den Schichten L II, III (vor allem im oberen Abschnitt) und in geringerem Maße in L V. L I (am Unterrand) und L VI sind spärlicher mit markierten Zellen bestückt. Schicht III enthält in den mittleren und tiefen Abschnitten ein bandartiges Areal, welches kaum gefärbte Neuronen enthält. Jedoch zeigen sich am Unterrand von Schicht III (in M1) oder am Unterrand von Schicht V (in S1, A1 und V1) einige wenige multipolare CR+ Somata von beachtlicher Größe (jeweils Pfeil in M1, S1, A1 und V1). Für weitere Details s. Text.

### **Großer Tümmler:**

Auch hier zeigt das Anti-Calretinin-Labeling ein arealübergreifendes Muster und die CR+- Somata in M1, S1, A1 und V1 sind ähnlich angeordnet wie beim Schweinswal (vgl. Abb. 3.5-7). Bei *Tursiops* scheint die Immunreaktivität der Perikarya in S1 und A1 im Vergleich zu M1 und V1 weiter in Schicht III hinein ausgedehnt. Allgemein gesehen erreichen die großen gelabelten Perikarya hier kaum die Dimension der größten CR+- Neuronen von *Phocoena*. Vereinzelt großkalibrige Somata finden sich in Höhe L III/V.

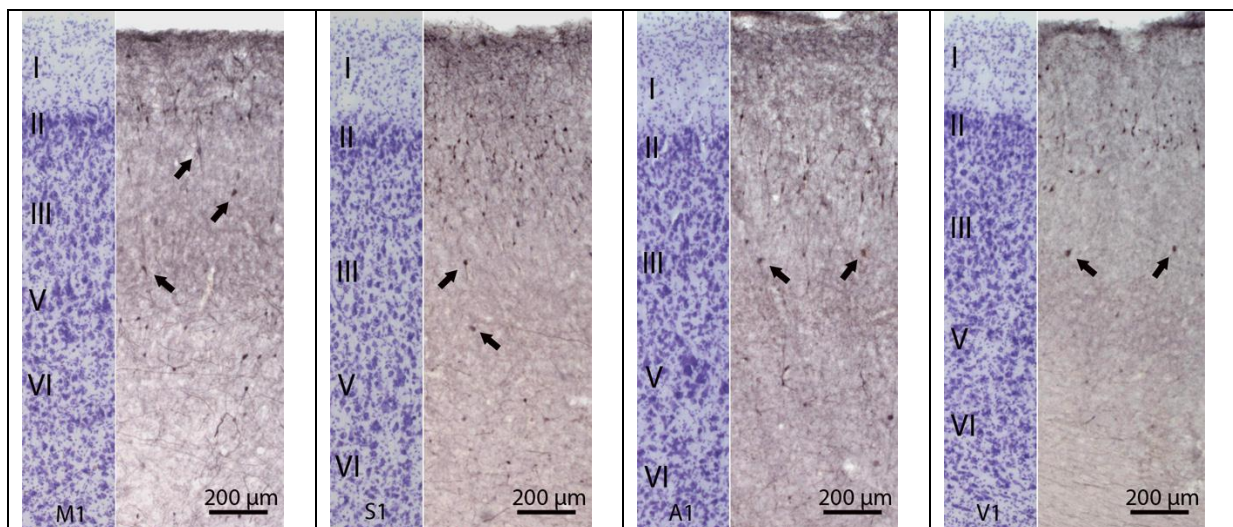
In **Areal M1** sind vor allem in L II, III (im oberen Abschnitt) und in L V (im unteren Abschnitt) gelabelte, meist vertikal orientierte Neuronen erkennbar. Schichten I und VI enthalten nur vereinzelt CR+ -Zellen. Die mittleren und tieferen Regionen von Schicht III enthalten einige große CR+ -Zellen.

**Areal S1** enthält wie M1 vor allem in L II, III (oberer Abschnitt) und L V (unterer Abschnitt) meist vertikal orientierte, CR+- Zellen. L I (unterer Abschnitt) und L VI sind spärlich mit immunreaktiven (ir) Zellen besetzt. Auch in diesem Areal finden sich in den mittleren Abschnitten von L III einige wenige großkalibrige Zellen (Pfeile).

Das **Areal A1** beherbergt CR+ Zellen ebenfalls vornehmlich in L II, III (im jeweils oberen Anteil) und L V. Schicht I (am Unterrand), L III (mittlerer und unterer

Abschnitt) und L VI enthalten nur wenige CR<sup>+</sup> -Zellen. In der weniger reaktiven mittleren und unteren L III befinden sich einige wenige große CR<sup>+</sup> -Neuronen.

Im **Areal V1** scheinen die ir Perikaryen auf die obere Hälfte des Kortex beschränkt: hier liegen die CR<sup>+</sup> -Zellen vor allem in L II und L III (am Oberrand). Schichten I (am Unterrand), III (im mittleren und unteren Bereich), V und VI enthalten nur sehr wenige gelabelte Zellen. In L III finden sich im mittleren Bereich einige wenige großkalibrige CR<sup>+</sup> -Neuronen.



**Abb. 3.5-7: Anti-Calretinin- markierte Zellen im Kortex des Großen Tümmlers.**

Ähnlich dem Schweinswal (vgl. Abb. 3.5-6) zeigt auch dieser Zahnwal ein arealübergreifendes Muster, in welchem die vornehmlich vertikal orientierten CR<sup>+</sup> -Neuronen vor allem in den Schichten II und III (obere Abschnitte) und vereinzelt in Schicht VI enthalten sind. In einem Band von relativ geringer CR<sup>+</sup>-Immunreaktivität in Höhe Schichtkomplex III/V finden sich darüberhinaus vereinzelt großkalibrige CR<sup>+</sup>-Neuronen (Pfeile). Für weitere Details s. Text.

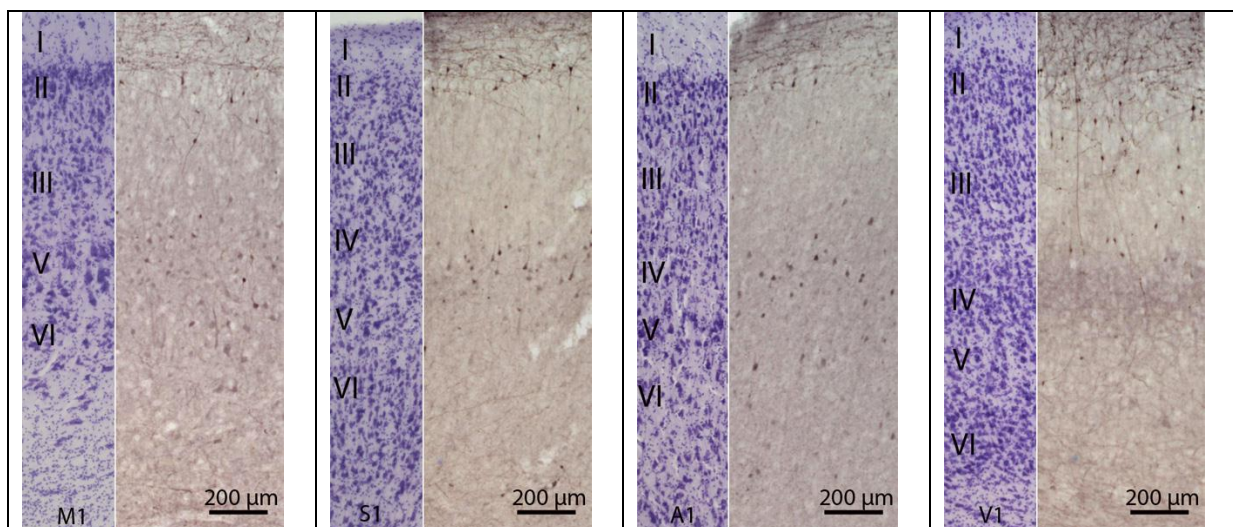
### Schwein:

Im Gegensatz zu den bisher behandelten Zahnwal-Spezies ist die Calretinin-IR hier allgemein weniger in L III, sondern in L I und L II, teilweise auch in L V offensichtlich, wobei im Falle von L I/II stets auch Fortsätze intensiv gelabelt sind (siehe Abb.3.5-8): In **Areal M1** weisen vor allem L II, V und VI gefärbte Neuronen auf. Schicht I (am Unterrand) und Schicht III (im oberen und unteren Abschnitt) zeigen vereinzelt markierte Zellkörper. Insgesamt jedoch wirkt Schicht III eher frei von CR<sup>+</sup> -Zellen.

Im **Areal S1** zeigen vor allem L II und IV eine Vielzahl gefärbter Neuronen. Am Unterrand von L I sind ebenfalls vereinzelt markierte Zellen erkennbar. Dagegen wirken die Schichten III, V und VI bis auf wenige Ausnahmen insgesamt frei von CR<sup>+</sup> -Zellen.

**Areal A1** zeigt wie Areal S1 vor allem in den Schichten L II und IV eine deutliche CR+ -Immunreaktivität. Zusätzlich sind einige wenige markierte Neuronen in den Schichten I (am Unterrand), III (in den tiefen Abschnitten), V (in den unteren Abschnitten) und VI erkennbar. In Schicht III wiederum zeigt sich insgesamt ein Band, das überwiegend frei von CR+ Zellen ist.

Im **Areal V1** sind CR+- markierte Zellen vor allem in den Schichten I, II und III zu finden. Die tiefer gelegenen Schichten IV, V und VI wirken dagegen weitgehend frei von CR+ -Somata. Eine Bande mit äußerst gering ausgeprägter CR-Immunreaktivität scheint in L III vorhanden, ähnlich den beiden Zahnwal-Spezies.



**Abb. 3.5-8: Anti-Calretinin- markierte Zellen im Kortex des Schweins.**

In allen Arealen finden sich CR+- Zellen gehäuft in den Schichten I (meist am Unterrand) und II, zusammen mit deutlichen Fasergeflechten. Schicht III scheint in allen vier Arealen (vor allem in M1, S1 und A1) ein Band geringer CR+-Immunreaktivität zu enthalten. Für weitere Details s. Text.

### Schaf:

Verglichen mit den bisher besprochenen Spezies ist die Calretinin-IR hier deutlich schwächer ausgeprägt (vgl. Abb. 3.5-9). Dabei wirken die Zellkörper der wenigen CR+ -Neuronen in den Schichten III und V relativ groß und prägnant, was darauf hindeutet, daß der Kortex des Schafs tatsächlich relativ wenige CR+ -Neuronen enthält.

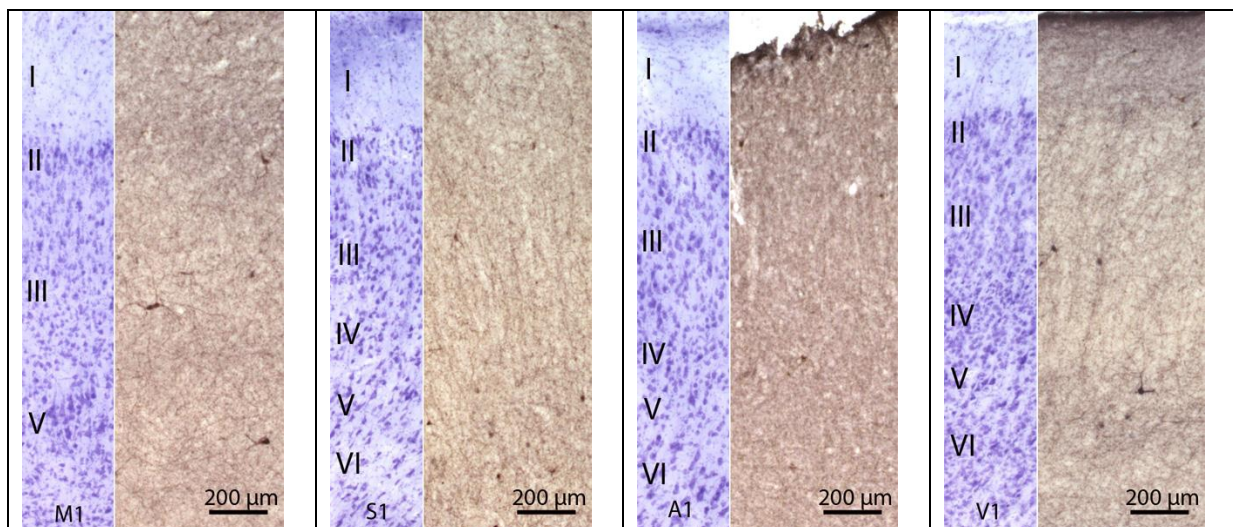
In **Areal M1** sind in den Schichten I, II, III und V einzelne Neuronen gelabelt; dieselben sind allerdings besonders groß, sowohl im Vergleich mit denen in den Arealen S1-V1 als auch mit den Verhältnissen beim Schwein, während die Delphine ihrerseits ebenfalls einzelne recht große Perikarya aufweisen.



In **Areal S1** sind in den Schichten I, II, III, V und VI einzelne markierte Neuronen zu erkennen. Die Schichten V und VI scheinen dabei vergleichsweise besser mit CR+-Neuronen bestückt. L IV scheint frei von zellulärer Immunreaktivität.

Im **Areal A1** sind einzelne CR+ Zellen in den Schichten I, II, III, IV und VI anzutreffen.

Das **Areal V1** zeigt gelabelte Neuronen in den Schichten I, II, III und V/VI. Die positiv markierten Zellen in Schicht III und V sind teilweise relativ groß.



**Abb. 3.5-9: Anti-Calretinin- markierte Zellen im Kortex des Schafes.**

Bei insgesamt eher spärlicher Immunreaktivität sind ir Neuronen vor allem in den Schichten I, II, III und V zu erkennen. In S1 enthält Schicht VI zusätzlich einzelne markierte Neuronen. In den Arealen M1, V1 (Schichten III und V) und in S1 (Schicht III) besitzen die CR+- Zellen mitunter relativ große Somata. Für weitere Details s. Text.

### Hund:

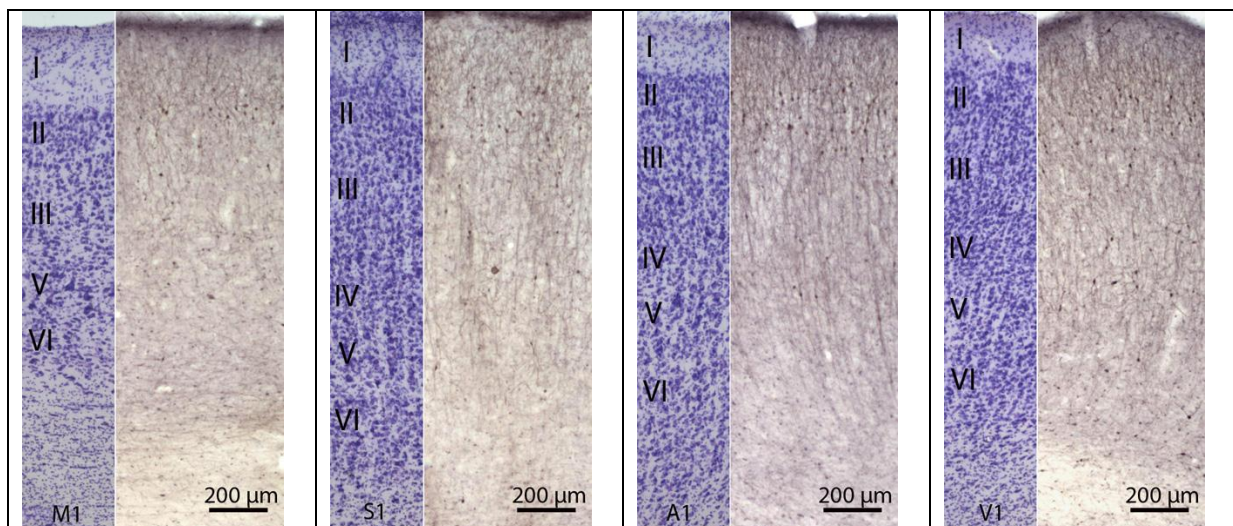
Die CR+-Immunreaktivität beim Hund steht in gewisser Weise zwischen der beim Schwein und jener bei den Delphinen. Die Perikarya sind meist eher klein und nur ganz selten einmal sehr groß (Solitär; Abb. 3.5-10: S1) wie beim Schweinswal. Ansonsten sind sie tendenziell in den oberflächennahen Schichten (L I- III) lokalisiert, wobei sich in der unteren Hälfte von L III eine reaktionsarme Bande andeutet; lediglich V1 weist in den Schichten IV- VI durch viele fast gleichmäßig verteilte kleine Somata eine deutlichere IR auf.

Im **Areal M1** befinden sich die CR+- Zellen überwiegend in den Schichten II, III (besonders im oberen Teil) und V. Schichten I und VI enthalten ebenfalls einige wenige markierte Neuronen.

Im **Areal S1** liegen die ir Zellen vor allem in Schicht II und am Unterrand der Schicht III. Die CR+- Neuronen zeigen hier zuweilen eine auffallende Größe (Solitär). L I und L V enthalten nur vereinzelt markierte Zellen und Schicht III (in den mittleren Anteilen) samt Schicht VI wirken relativ frei von CR+- Zellen.

Das **Areal A1** zeigt vor allem in den Schichten L I, II und III (oberer Abschnitt) sowie L V (am Übergang zu Schicht IV) eine Vielzahl CR+ -Neuronen. Dagegen enthalten die Schichten III (untere Regionen), IV und VI kaum ir Zellen. Im oberen Bereich von Schicht III sind manche CR+ -Perikaryen relativ groß.

Die Probe aus dem **Areal V1** zeigt in allen sechs Schichten markierte Zellen. Lediglich in den Schichten III und V (jeweils unterer Abschnitt) scheinen die CR+- Zellen spärlich.



**Abb. 3.5-10: Anti-Calretinin- markierte Zellen im Kortex des Hundes.**

In allen vier Arealen enthalten vorwiegend die Schichten II und III (vor allem im oberen Anteil) CR+- Zellen. Zusätzlich sind bei allen Arealen auch in den Schichten I, V und VI Zellen gelabelt, wenn auch eher spärlich. Schicht III wirkt im unteren Abschnitt in allen vier Regionen eher zellarm, beinhaltet vereinzelt aber großkalibrige Neuronen (Übergang zu Schicht IV in S1; zu Schicht II in A1). Schicht IV der koniokortikalen Areale S1, A1 und V1 enthält nur wenige CR+- Neuronen. Für weitere Details s. Text.

### **Gorilla:**

Bei diesem Menschenaffen fällt im CR+- Präparat sofort die relativ hohe Zahl an vergleichsweise kleinen immunreaktiven (ir) Zellen auf, welche mit der hohen Gesamtzahl an kortikalen Neuronen bei Primaten korreliert. Die ir Zellen stehen in dem vergleichsweise dickeren Kortex in L II/ III besonders dicht, dünnen aber schon ab der Mitte von L III mehr oder minder schnell aus und fallen schon in L V nur noch wenig ins Auge (vgl. Abb. 3.5-11; L VI in M1 aus fotografischen Gründen [Wahrung

eines einheitlichen Maßstabs für den korrekten Vergleich der Abbildungen] hier nicht erfasst):

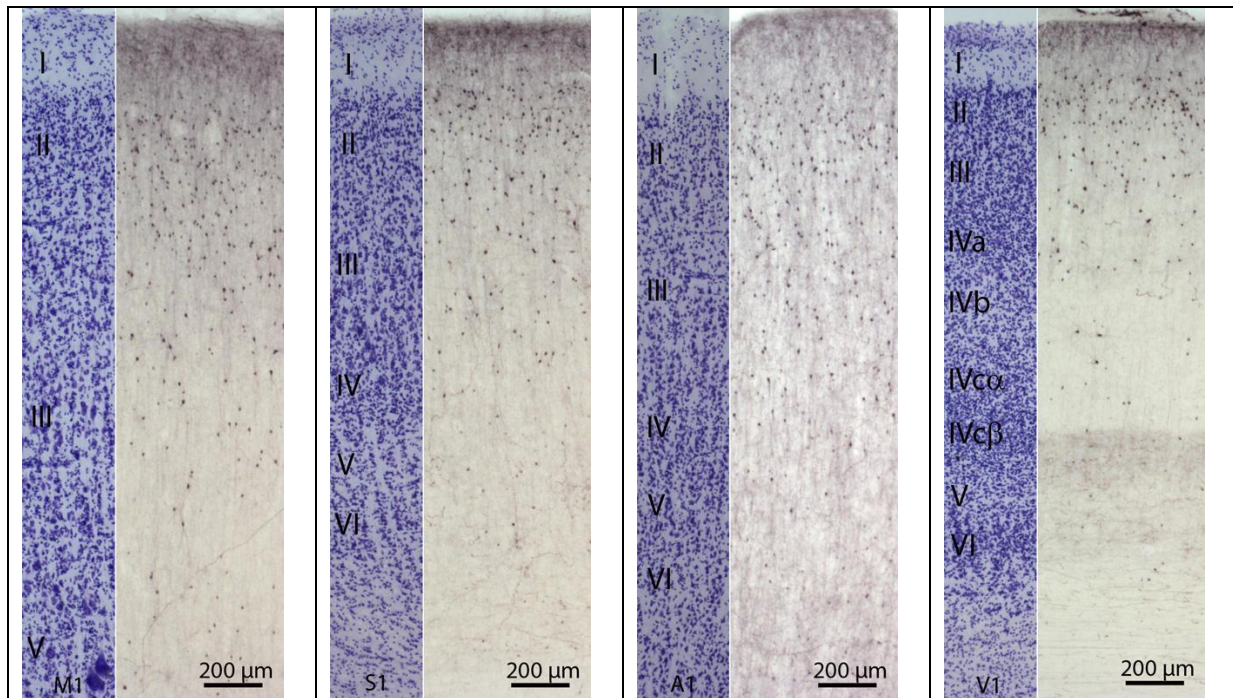
Im **Areal M1** liegen die CR+- Zellen vor allem in den Schichten II und III (hier besonders in der oberen Hälfte). Am Unterrand von Schicht I, in der unteren Hälfte von Schicht III und in Schicht V finden sich nur vereinzelt markierte Zellen.

Das **Areal S1** beinhaltet CR+- Zellen vor allem in den Schichten L I (am Unterrand), sowie in L II und L III (jeweils obere Hälfte). Dagegen sind Somata in L IV- VI spärlich vorhanden und hier anscheinend noch kleiner als in Areal M1.

Im **Areal A1** sind die CR+- markierten Zellen vor allem in den Schichten L II, III sowie in L IV (hier oberer Anteil) zu finden. Die unteren Regionen der Schichten I und IV sowie die gesamte Breite der Schicht V sind durch rarefizierte, recht kleine Neuronen charakterisiert. Schicht VI enthält so gut wie keine CR+- Zellen.

Im **Areal V1** sind die ir Neuronen besonders stark in L II konzentriert; doch scheint die Zahl der markierten Zellen insgesamt deswegen nicht höher. Im Gegenteil ist die Ausdünnung der Somata nach basal hier noch stärker als in Areal S1, wobei die letzten größeren Perikaryen in L IVb auftreten und in den basal verbleibenden Schichten (IVc $\alpha$ , IVc $\beta$ , V, VI) nur noch vereinzelt Zellen weit verstreut vorhanden sind. Interessanterweise ist auch hier konstant eine Bande von diskreter potentieller Immunreaktivität vorhanden. Diese vermittelt zwischen den Schichten IVc $\beta$  und V: während sie im Nissl-Bild durch eine Unmenge kleinster Körnerzellen gekennzeichnet ist, kommt die Immunreaktivität möglicherweise durch feinstes Neuropil zustande.





**Abb. 3.5-11: Anti-Calretinin- markierte Zellen im Kortex des Gorillas.**

Allgemein zeigen die CR+- Zellen arealübergreifend eine Tendenz zur Konzentration in den höheren Schichten II und III, wo sie in relativ hoher Dichte auftreten. Nach basal nimmt die Zahl an gelabelten Zellen schnell ab, so dass in Schicht IV der koniokortikalen Areale S1, A1 und V1 vereinzelt CR+- Zellen zu finden sind, während in den tieferen Schichten V und VI nur noch wenige vorliegen. Für weitere Details s. Text.

### **Mensch:**

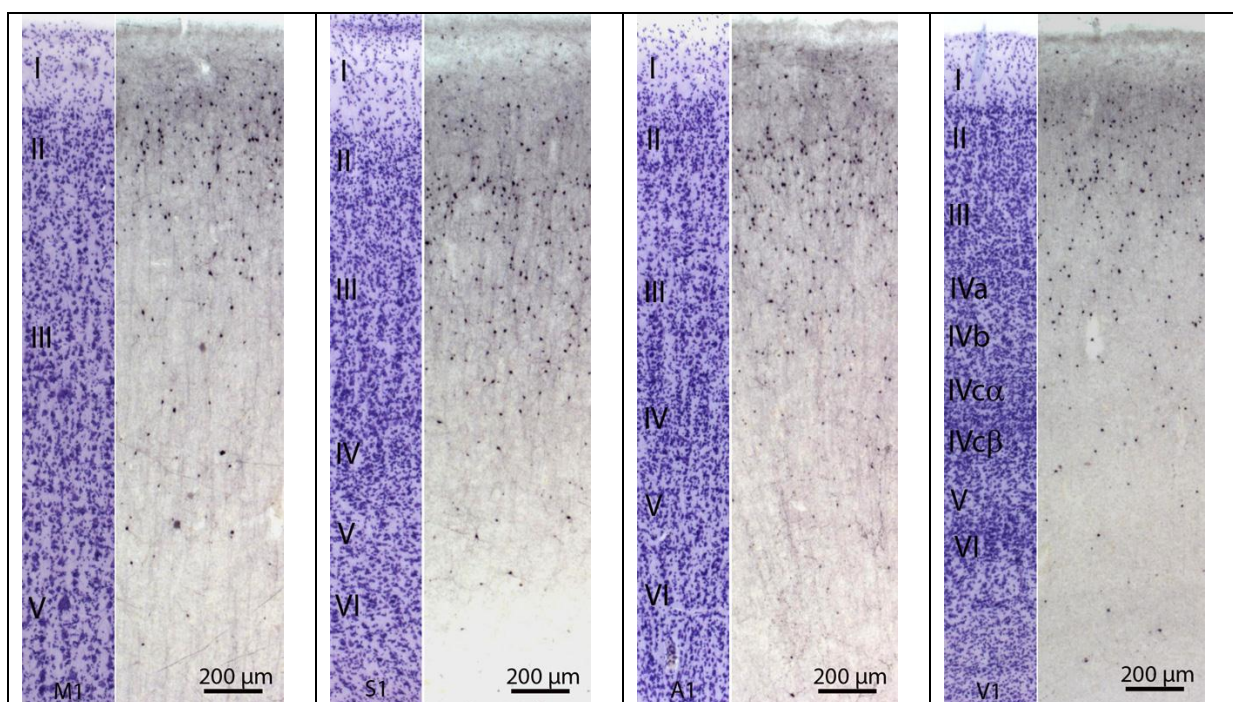
Beim Menschen ergibt die immunhistochemische Markierung der Hirnrinde gegen den Calciumbinder Calretinin ein dem Gorilla recht ähnliches Bild (vgl. Abb. 3.5-11 und 3.5-12). Unterschiede zwischen den beiden Spezies bestehen darin, dass beim Menschen tendenziell mehr größere CR+-Neuronen vorhanden sind, wobei die Zelldichte generell am Übergang L II/ III am höchsten ist und die größeren Perikarya in den Arealen M1, S1 und V1 weiter nach basal vordringen, vor allem aber in M1.

Im **Areal M1** sind CR+- Zellen vor allem in L I (basal) sowie in L II und III (jeweils vor allem in den oberen Abschnitten) zu finden. Schicht IV ist in diesem Areal nicht ausgebildet, Schicht V (oberflächlich) enthält relativ spärlich gelabelte Zellen, darunter wenige große bis sehr große Perikarya (Solitäre). Auch in den mittleren und unteren Abschnitten der Schicht III sind vereinzelt großkalibrige Zellleiber zu finden.

Das **Areal S1** ist ebenfalls besonders in den Schichten I, II und III (vor allem in den oberen Abschnitten) vergleichsweise reich an CR+- Neuronen. Die Schichten IV, V und VI zeigen dagegen nur vereinzelt markierte Zellen. Schicht III ist hier vergleichsweise zellreich.

Auch im **Areal A1** sind die CR+- Zellen vor allem in den oberflächlichen Schichten I, II und III konzentriert. Schicht IV und die darunterliegenden Schichten V und VI weisen nur sehr spärlich kleine markierte Zellen auf.

Ähnliches gilt auch für das **Areal V1**. Hier sind die markierten Zellen wiederum in den höheren Schichten I, II und III vermehrt zu finden. Schicht IV enthält in ihren Unterschichten IVa und IVb ebenfalls einige CR+- Zellen, doch mit zunehmender Kortextiefe nimmt die Zahl an CR+- Neuronen in den Schichten IVc $\alpha$ , IVc $\beta$ , V und VI kontinuierlich ab. Vereinzelte größere Perikarya können bis unterhalb von Schicht VI vorkommen.



**Abb. 3.5-12: Anti-Calretinin- markierte Zellen im Kortex des Menschen.**

Arealübergreifend sind die immunreaktiven Zellen vor allem in den höheren Schichten I, II und III konzentriert. Bei M1 liegen in Schicht III (vor allem in den mittleren und unteren Abschnitten) vereinzelt außerordentlich großkalibrige CR+ -Neuronen. Mit zunehmender Kortextiefe nimmt der Gehalt an markierten Zellen ab, doch sind dieselben hier tendenziell größer als beim Gorilla. Für weitere Details s. Text.

### 3.5.3 Anti-Parvalbumin

Die Verwendung des Antikörpers gegen das Calcium-bindende Protein Parvalbumin (PV) ergibt bei den einzelnen Säugern folgende Ergebnisse.

### **Schweinswal:**

Bei diesem Zahnwal zeigt sich arealübergreifend für M1-V1 eine ähnliche Immunreaktivität (vgl. Abb. 3.5-13): Das Labeling ist (verglichen mit der Situation bei Calretinin) vergleichsweise spärlich und selektiv weitgehend auf eine obere Zone (am Übergang L II-III) mit etwas mehr Zellen und eine untere Lokalisation (Übergang L V-VI) mit sehr wenigen Somata beschränkt. Es fällt auf, dass die PV+- Perikaryen bei *Phocoena* teilweise ganz erheblich größer sind als jene des Großen Tümmlers (vgl. Abb. 3.5-14). Eine horizontale Bande aus möglicherweise immunreaktivem Neuropil ist in Höhe von L V erkennbar (insbesondere in S1, A1 und V1).

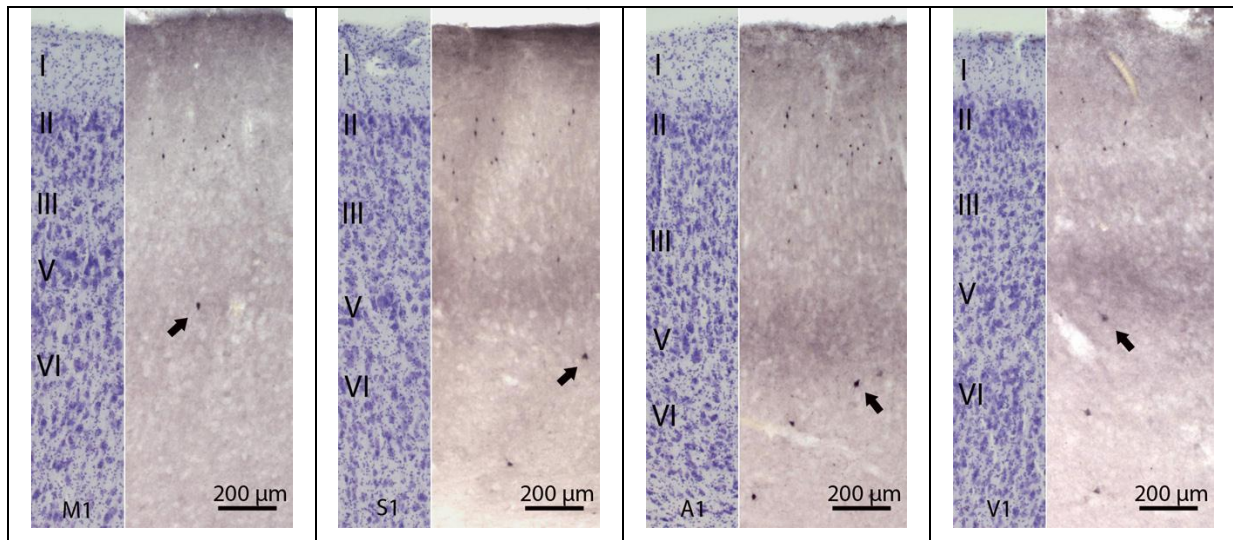
Im **Areal M1** liegen einige wenige kleine PV+ -Neuronen am Unterrand von Schicht I, in Schicht II und in den oberen Anteilen von Schicht III. Zusätzlich finden sich am Unterrand von Schicht V einzeln oder in sehr geringer Zahl vergleichsweise große, rundlich wirkende PV+ -Zellen (Solitäre). Die restlichen Anteile des Kortex sind dagegen frei von immunreaktiven Perikarya.

Das **Areal S1** zeigt ein ähnliches Bild: einige PV+ -Zellen befinden sich am Unterrand von Schicht I, vor allem aber in Schicht II und teilweise in Schicht III (hier vor allem in den oberen Abschnitten). Darüber hinaus finden sich am Unterrand der Schicht V wiederum wenige große, rund wirkende PV+ -Neuronen. Schließlich treten auch in der Tiefe von Schicht VI vereinzelt markierte, teilweise recht große Zellen auf. Ansonsten enthält der Kortex in diesem Areal keine weiteren PV+ -Neuronen.

In **Areal A1** liegen die markierten Zellen ebenfalls vornehmlich in den oberen Schichten. L I, II und III (letztere vor allem im oberen Abschnitt) enthalten einige kleine PV+- Zellen. Ähnlich wie in M1 und S1 sind auch hier in den Schichten V/VI wenige großzellige PV+ -Neuronen vorhanden.

**Areal V1** zeigt dasselbe Muster wie die drei anderen Areale: einige markierte Zellen befinden sich in den oberen Schichten: in L I (am Unterrand), in L II, sowie in L III (am Oberrand). Hinzu kommt auch hier eine geringe Zahl großer, rundlicher PV+ -Zellen in den tiefen Abschnitten von Schicht V. Zusätzlich enthält Schicht VI vereinzelt gelabelte Zellen.





**Abb. 3.5-13: Parvalbumin-positive Neuronen im Kortex des Schweinswals.**

Arealübergreifend zeigt sich eine PV+-Markierung vor allem bei Neuronen der Schichten I (untere Abschnitte) sowie II und III (obere Abschnitte). Zusätzlich befinden sich jeweils am Unterrand von Schicht V einige wenige, großkalibrige Zellen (Pfeil in M1, S1, A1 und V1). Schicht VI und die darunter liegende weiße Substanz enthalten nur vereinzelt PV+ -Zellen. Für weitere Details s. Text.

### Großer Tümmler:

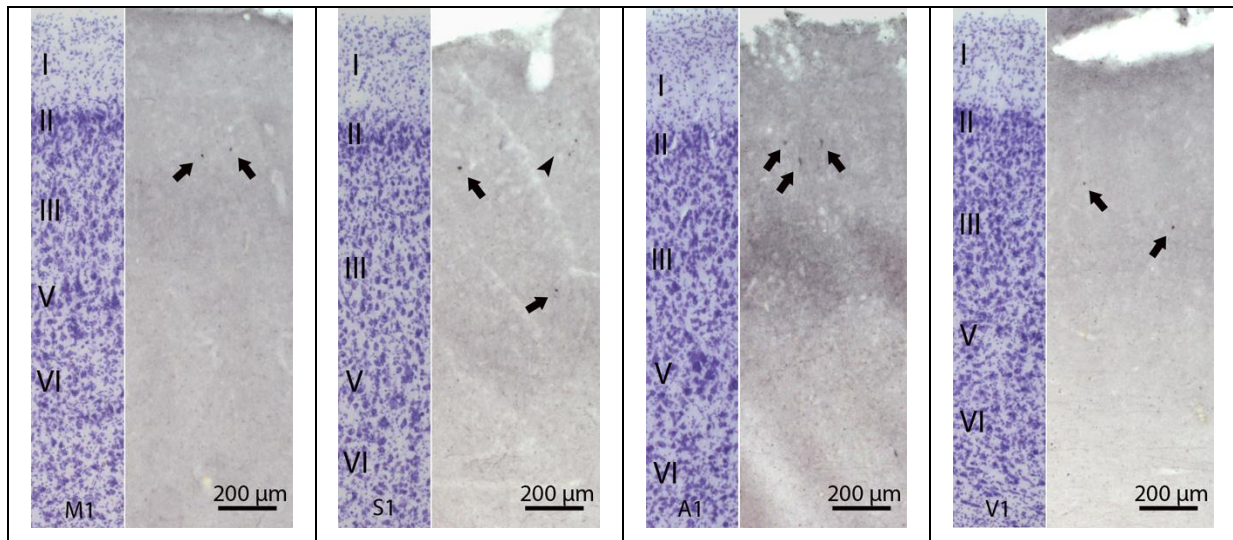
Bei diesem Zahnwal zeigt die Immunreaktivität gegen PV ein relativ undeutliches Muster (siehe Abb. 3.5-14). Generell ist das Labeling erheblich schwächer ausgeprägt als beim Schweinswal, obwohl die Schnitte beider Exemplare (*Phocoena*, *Tursiops*) unter denselben Bedingungen parallel prozessiert wurden. Interessanterweise sind die Neuronen (Perikaryen) beim Großen Tümmler noch stärker rarefiziert, schwächer gelabelt und vor allem deutlich kleiner als beim Schweinswal. Eine Erklärung könnte in einem unterschiedlich guten Erhaltungszustand der beiden Zahnwalgehirne zu suchen sein, doch ist diese These nicht bewiesen. Dagegen spricht die Situation bei den mit anti-Calretinin behandelten Schnitten (s.o.); hier liegen bei beiden Spezies ähnlich prägnante Verhältnisse vor. Bei Calbindin wiederum gab es für beide Spezies keinerlei Immunreaktivität. Eine Bandenbildung von immunreaktivem Neuropil liegt offenbar in L III von A1 vor.

Im **Areal M1** finden sich nur sehr wenige kleine PV+ -Somata in den oberen Regionen der Schicht III.

Im **Areal S1** sind markierte Zellen vereinzelt in den Schichten II und III lokalisiert (in den oberen Abschnitten und in der Mitte).

Das **Areal A1** zeigt gelabelte Zellen am Übergang von Schicht II zu Schicht III.

Im **Areal V1** liegen wenige PV+- Neuronen in den mittleren Abschnitten von Schicht III.



**Abb. 3.5-14: Parvalbumin-spezifisches Labeling im Kortex des Großen Tümmelers.**

Bei einer insgesamt wenig prägnanten Immunreaktivität liegen die PV+ -Neuronen arealübergreifend meist in den mittleren und oberen Anteilen von Schicht III und am Übergang zu Schicht II (jeweils Pfeile in M1, S1, A1 und V1). Ein Beispiel für PV+ -Neuronen am Übergang zu Schicht I zeigt das Areal S1 (Pfeilspitze). Für weitere Details s. Text.

### Schwein:

Bei diesem Huftier zeigen die einzelnen Kortexareale eine recht prägnante Immunreaktivität (vgl. Abb. 3.5-15): insgesamt ist der Kortex zwar vergleichsweise dünn, doch ist in allen Schichten Immunreaktivität vorhanden, wobei sich die Verteilung der Neuronen in den verschiedenen Arealen deutlich unterscheidet.

Im **Areal M1** liegen die Parvalbumin- positiven Somata vor allem in den Schichten III (mittlerer Abschnitt) und V, wobei innerhalb L V zwischen den generell eher kleinen PV+ -Zellen auch vereinzelt große Perikaryen liegen. Die Schichten II und VI enthalten wenige markierte Zellen, von denen teilweise auch Fortsätze sichtbar sind. Schicht I wirkt frei von PV+ -Zellen.

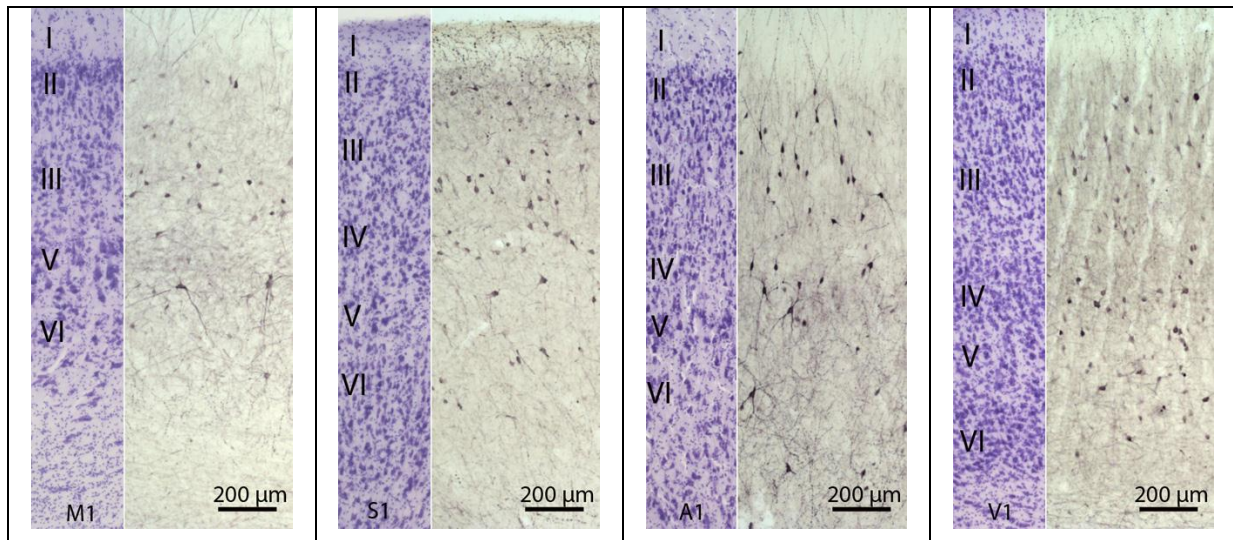
Im **Areal S1** enthalten vor allem die Schichten II, III und IV eine Vielzahl von mehr oder weniger dichtgepackten PV+ -Neuronen. In Schicht V befinden sich zwischen wenigen kleineren PV+ -Zellen auch vereinzelt etwas größere Zellkörper markierter Neuronen. Schicht VI enthält ebenfalls einige kleinere PV+ -Neuronen. Schicht I dagegen enthält bis auf deutlich immunreaktives Neuropil keinerlei gefärbte Zellen.

Im **Areal A1** liegen die markierten Zellen ebenfalls vornehmlich in den Schichten L II (am Unterrand) sowie in L III und L IV. In L II und L III sind diese Zellen zumeist schlank und entsenden vertikal orientierte Fortsätze. Am Übergang L IV/L V sind unter wenigen kleinen Neuronen vereinzelt größere multipolare PV+ -Zellen zu erkennen. Insgesamt sind für Areal A1 vergleichsweise deutlich markierte



Zellfortsätze typisch, welche vor allem in L V imponieren. Auch Schicht VI zeigt nur wenige gelabelte Zellen und Schicht I wirkt größtenteils frei von markierten Zellen.

Das **Areal V1** beinhaltet Perikaryen von PV+- Neuronen überwiegend in den Schichten III, IV und V. Vor allem in Schicht IV scheinen die markierten Somata vergleichsweise dicht gepackt. Schicht II (am Übergang zu Schicht III) und VI enthalten wenige und Schicht I keine PV+- Zellen.



**Abb. 3.5-15: Anti-Parvalbumin- markierte Neuronen in der Hirnrinde des Schweins.**

In den einzelnen Arealen sind PV+ -Zellen hauptsächlich in den Schichten III und bei S1-V1 auch in Schicht IV zu finden. Schicht V enthält mitunter auch größere Zelleiber (M1-A1). Schicht I dagegen wirkt zellfrei, jedoch reich an immunreaktivem Neuropil. Für weitere Details s. Text.

### Schaf:

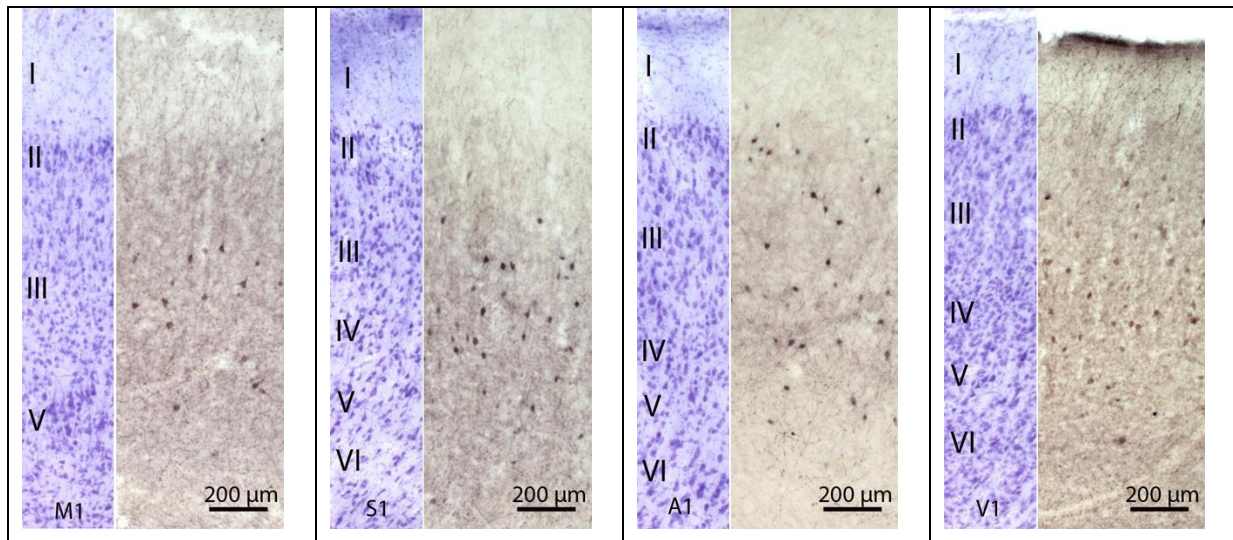
Bei diesem Tier zeigen die immunhistochemisch gefärbten Kortexareale ein ähnliches Bild wie beim Schwein (vgl. Abb. 3.5-15 und 3.5-16). Allerdings ist die Immunreaktivität tendenziell stärker auf die Schichten III- V konzentriert. L I ist stets, L II fast immer ungelabelt. Lediglich Areal A1 weist hier ein paar immunpositive Perikaryen auf. Insgesamt fehlen die für das Schwein typischen vielen Zellfortsätze, v.a. in Areal A1.

Im **Areal M1** liegen die positiv markierten Zellen hauptsächlich in Schicht III (hier vor allem im mittleren Abschnitt) und in Schicht V. Die übrigen Layers enthalten keine immunreaktiven Neuronen.

Im **Areal S1** befinden sich die PV+ -Zellen vornehmlich in L III (im unteren Abschnitt) und in L IV. Auch L V und VI enthalten vereinzelt gelabelte Neuronen, dagegen sind L I und II völlig frei von immunreaktiven Perikaryen.

In **Areal A1** sind PV+ -Neuronen relativ weitläufig über die Schichten L II- V verteilt. L I (nur unterster Abschnitt) und L VI enthalten dagegen kaum ir Zellen.

Im **Areal V1** sind die PV+ -Zellen vor allem in L III (besonders in den mittleren und unteren Abschnitten) und in L IV lokalisiert. Erkennbar hierbei ist ein relativ dichtes Band von markierten Zellen innerhalb L IV. Auch L V und VI enthalten vereinzelt PV+ -Zellen. Dagegen sind L I und II frei von gelabelten Perikaryen.



**Abb. 3.5-16: Parvalbumin- positive Zellen in der Hirnrinde des Schafes.**

Die PV+ -Neuronen sind vor allem auf die mittleren Hirnrindenschichten III und IV (S1-V1) konzentriert. Auch die Schichten V und VI enthalten vereinzelt gefärbte Neuronen. Dagegen sind die Schichten I und II (mit Ausnahme von A1) frei von PV+ -Neuronen. Beachte die relative Verdichtung kleiner PV+ -Neuronen in Schicht IV (besonders in S1 und V1). Für Details s. Text.

### Hund:

Die immunhistochemische Analyse der einzelnen Hirnrindenareale zeigt beim Hund folgende Ergebnisse (vgl. Abb. 3.5-17): Entsprechend dem Nissl-Bild sind die markierten Perikarya hier tendenziell eher klein. Die Immunreaktivität scheint hier besonders auf die Schichten III- V konzentriert. L I und L II scheinen dagegen fast ungelabelt.

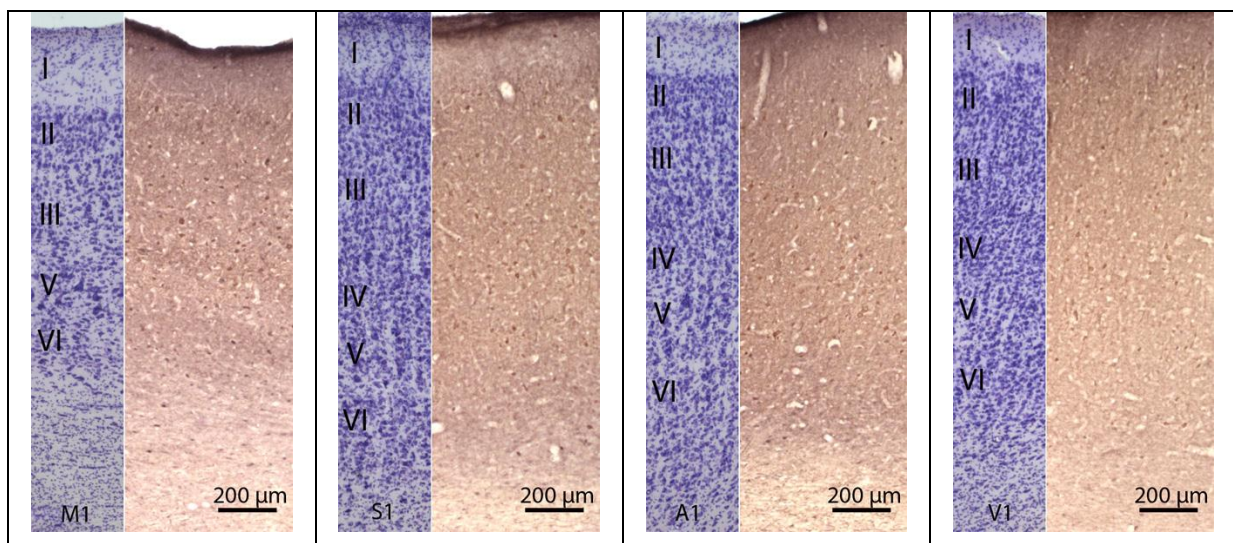
Im **Areal M1** liegen die PV+ -Zellen vor allem in L III (vermehrt im mittleren und unteren Abschnitt) und in L V. Einige wenige ir Neuronen in L III besitzen relativ große Zellleiber. L II und VI sind spärlicher mit markierten Zellen versehen und L I zeigt einzelne ir Zellen.

Das **Areal S1** enthält PV+ -Zellen vor allem in L II, III und IV. In den oberen Abschnitten von L III sind mitunter auch größere Perikaryen zu finden. Darüberhinaus

besitzen L V und VI vereinzelt PV+ -Zellen. L I enthält wiederum einzelne immunreaktive Perikaryen.

Im **Areal A1** befinden sich PV+ -Neuronen überwiegend in L III (vor allem in den mittleren und unteren Abschnitten) sowie in L IV und L V. L II und L VI besitzen vereinzelt markierte Zellen. Schicht I dagegen zeigt bis auf einzelne Ausnahmen keine PV+ -gelabelten Neuronen.

Im **Areal V1** liegen die PV+- markierten Somata vorzugsweise in L III sowie in L IV und L V. Die Schichten L II und L VI zeigen nur vereinzelt gelabelte Zellen und L I wirkt völlig frei von PV+ -Perikaryen.



**Abb. 3.5-17: Parvalbumin- positive Zellen in der Hirnrinde des Hundes.**

Die markierten Zellen liegen zumeist in den mittleren Schichten III und IV (S1-V1) sowie teilweise in Schicht V. In den Arealen M1-A1 sind in Schicht III vereinzelt markierte Neuronen mit relativ großen Perikaryen zu finden. Die übrigen Schichten enthalten nur wenige (L II und VI) oder keine PV+ -Zellen (L I). Für Details s. Text.

### Gorilla:

Bei diesem Tier zeigt die immunhistochemische Behandlung der einzelnen Areale unterschiedliche Ergebnisse (vgl. Abb. 3.5-18).

Das **Areal M1** besitzt PV+ -Neuronen vor allem in den Schichten II und III. Schicht III enthält dabei auch etliche für den Gorilla maximal große markierte ir Perikarya. In Schicht V befinden sich relativ wenige PV+ -Neuronen und Schicht I zeigt lediglich am Unterrand einzelne sehr kleine markierte Zellen. Bei dem ungewöhnlich dicken Kortex von Areal M1 konnte L VI hier aus Gründen der graphischen Vergleichbarkeit nicht dargestellt werden.

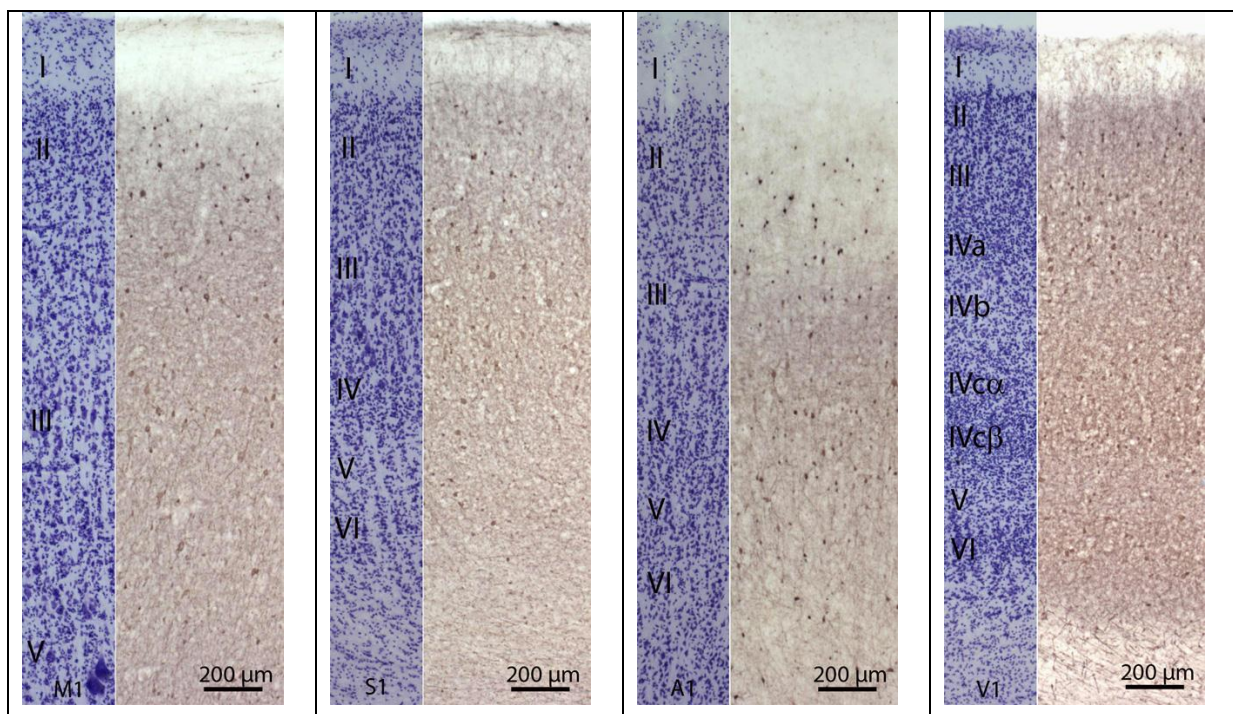
Im **Areal S1** liegen PV+ -Zellen vorzugsweise in L II (vor allem im unteren Abschnitt)



sowie in L III und IV. In den oberen und mittleren Abschnitten von L III fallen manche dieser Zellen recht groß aus. Auch L V und VI (nicht dargestellt) enthalten einzelne kleine PV+ -Neuronen. Im Gegensatz dazu weist Schicht I keinerlei PV+ - IR auf.

Im **Areal A1** sind PV+ -Neuronen fast über die gesamte Kortextiefe verteilt, besonders häufig aber in den Schichten L II (unterer Teil), in L III (oberer Teil) sowie in L IV-VI. Im Gegensatz zu den bereits besprochenen Arealen M1 und S1 sind die Kaliber der immunreaktiven Perikarya im Areal A1 nicht sehr unterschiedlich. In Schicht I gibt es so gut wie keine ir Zellen, während die oberen Anteile von Schicht II und die unteren Anteile von Schicht V sowie Schicht VI wenige kleine markierte Neuronen enthalten.

Das **Areal V1** beherbergt eine beachtliche Menge von PV+ -Zellen in den Schichten II und III (hier besonders in den jeweils unteren Abschnitten), sowie in den Schichten IV und VI. Dabei sind in L IV hauptsächlich die Unterschichten IVa, IVc $\alpha$  und IVc $\beta$  dicht mit PV+ -Zellen besetzt. Während jene in Unterschicht IVa vergleichsweise große Kaliber aufweisen, sind jene in IVc $\beta$  offenbar minimal klein. Unterschicht IVb und V wirken zellarm, Schicht I ist sogar frei von markierten Somata.



**Abb. 3.5-18: Parvalbumin- positive Zellen in der Hirnrinde des Gorillas.**

Die markierten Zellen sind in den jeweiligen Arealen zumeist in den Schichten II und III zu finden, in den koniokortikalen Arealen (S1, A1, V1) zusätzlich auch in Schicht IV. In den oberen und mittleren Anteilen von Schicht III können einige PV+- Zellen ein größeres Soma besitzen (vor allem in M1 und S1). Schicht V und VI zeigen nur wenige PV+- Neuronen, Schicht I ist frei von immunreaktiven Zellen. Für Details s. Text.

### Mensch:

Beim Menschen zeigt die Bearbeitung der Kortexproben mit dem Antikörper gegen das Calcium- bindende Protein Parvalbumin ein dem Gorilla ähnliches Bild (vgl. Abb. 3.5-18 und 3.5-19). Allerdings sind die ir Neuronen tendenziell kleiner als beim Gorilla, vor allem in den Arealen M1, S1, A1, und etwas weniger deutlich in V1;

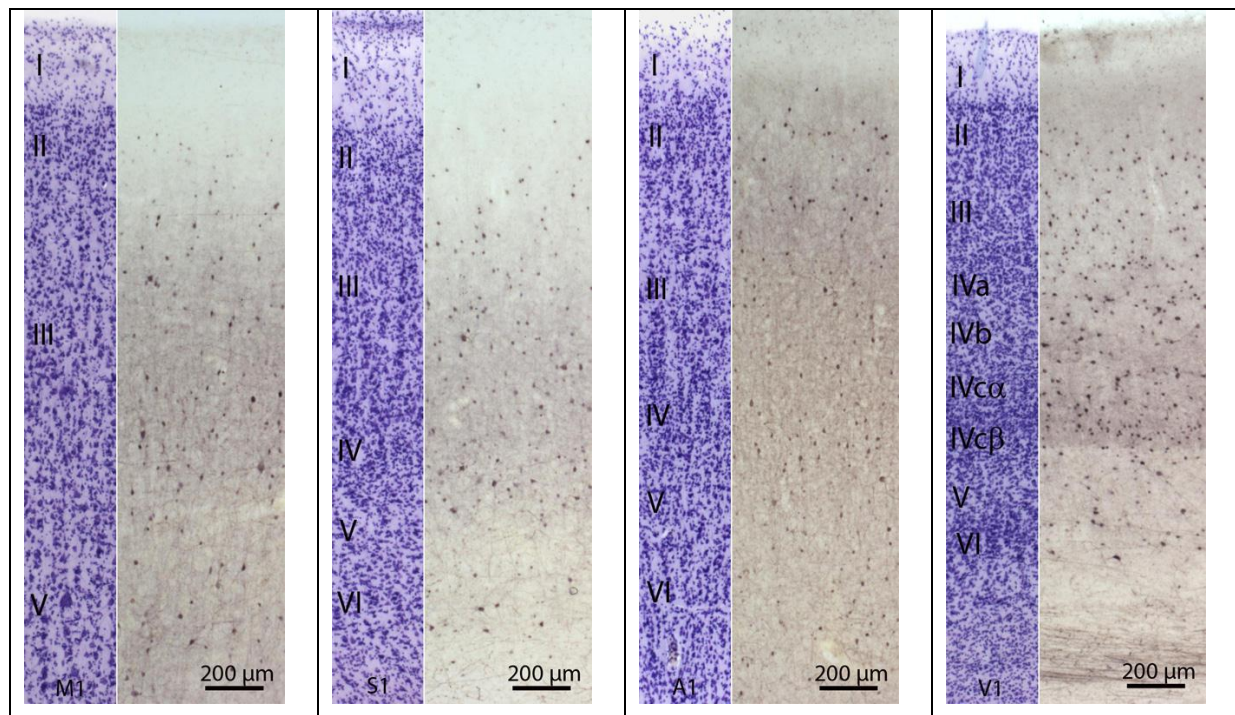
Im **Areal M1** sind die markierten Neuronen vornehmlich in den Schichten II, III und V (obere Zone) lokalisiert. Dabei finden sich in den mittleren und tiefen Bereichen von Schicht III vereinzelt großkalibrige PV+ -Zellen. Die oberste Zone von Schicht II und die Gesamtheit von Schicht I sind dagegen nur äußerst spärlich mit gelabelten Zellen bestückt. Schicht VI enthält wenige PV+- Neuronen (L VI in M1 in Abb. 3.5-19 aus Gründen der photographischen Vergleichbarkeit nicht dargestellt, s.o.).

Im **Areal S1** gehören die markierten Zellen vor allem zu den Schichten III und IV. Die unteren Anteile von Schicht II, die oberen Anteile von Schicht V und der gesamten Schicht VI enthalten einige PV+ -Zellen. Dagegen finden sich in L I, den oberen Bereichen von L II und den unteren Bereichen von L V nur sehr wenige Somata von ir Zellen.

Das **Areal A1** weist gelabelte Perikaryen vor allem in den Schichten II (im unteren Bereich), III, IV und V (im oberen Bereich) auf. Auch die unteren Anteile von Schicht V sowie Schicht VI beinhalten einige locker verteilte markierte Zellen. Dagegen wirken Schicht I und die obere Region von Schicht II zellarm.

Im **Areal V1** sind zahlreiche PV+ -Zellen vor allem in den Schichten III, IV und VI zu finden. Schicht II (im unteren Teil), mehr noch Schicht V enthält einige Anti-PV-markierte Somata. Schicht I und der Übergang zum oberen Teil von Schicht II dagegen wirken weitgehend frei von markierten Perikarya. Eine horizontale Bande potenziell immunreaktiven Neuropils findet sich auf Höhe der Schicht IVc $\beta$ ; nach unten hin (gegen layer V) ist die Bande scharf begrenzt.





**Abb. 3.5-19: Anti-Parvalbumin- markierte Zellen im Kortex des Menschen.**

PV+- Zellen werden zahlreich in den mittleren Schichten II, III und IV (vor allem in V1) angetroffen, teilweise auch in L VI. In Schicht III finden sich vereinzelt größere PV+- Somata (vor allem in M1 und S1). Schicht V besitzt nur in den oberen Anteilen wenige PV-markierte Neuronen. Schicht I ist mit wenigen Ausnahmen arealübergreifend frei von PV+- Perikarya. Für Details s. Text.

### 3.5.4 Anti-Neurofilament

Bei der immunhistochemischen Bearbeitung der Kortexproben mit anti - Neurofilament (NF) ergeben sich bei den einzelnen Spezies folgende Resultate, wobei dieser Antikörper bei manchen Exemplaren der vorliegenden Studie ein eher schwach ausgeprägtes Labeling zeigt.

#### Schweinswal:

Bei Testung mit diesem Antikörper zeigten die Kortexproben des Schweinswals keine verwertbare Markierung.

#### Großer Tümmler:

Beim Großen Tümmler dagegen finden sich in den Arealen trotz schwacher Ausprägung jeweils spezifische Zellfärbungen (entsprechend durch Kontrollfärbungen bestätigt, siehe Kap. 2.3.5). Dabei ergibt sich ein arealübergreifendes Muster (vgl. Abb. 3.5-20).

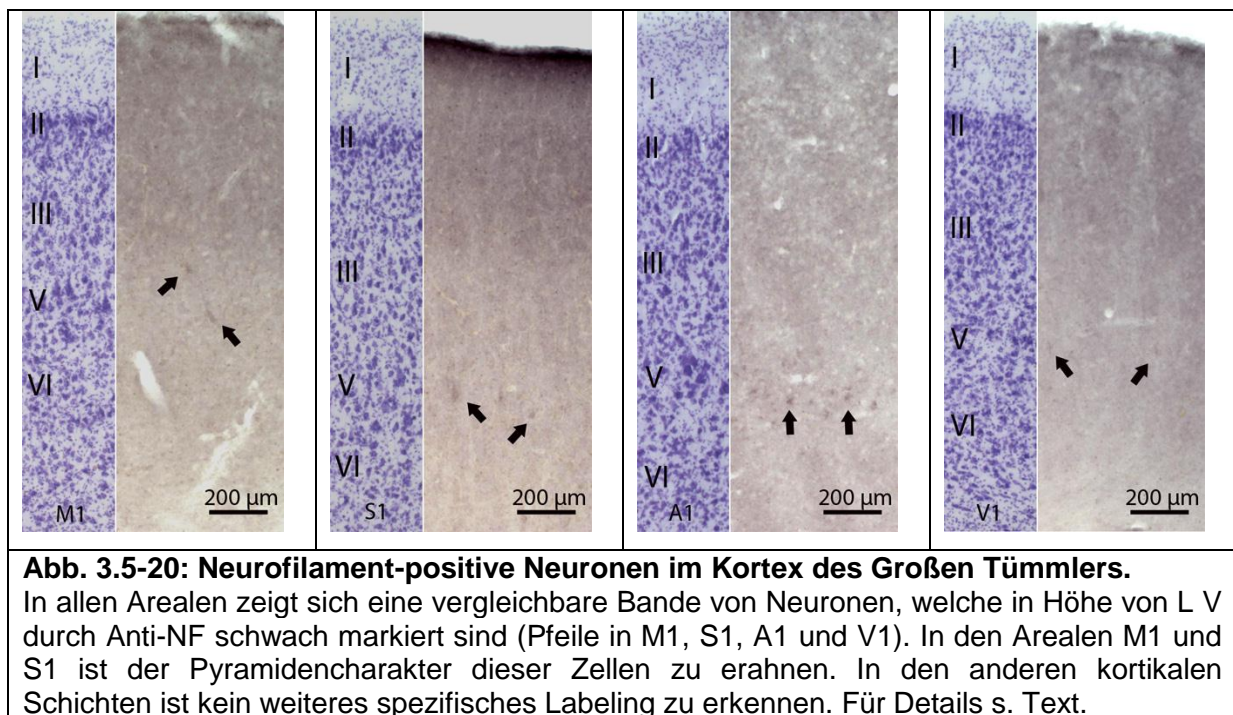
Im **Areal M1** sind vereinzelt einige Pyramidenzellen aus den oberen und mittleren Anteilen von Schicht V schwach immunreaktiv. Die übrigen Schichten enthalten

dagegen keinerlei Labeling.

Auch im **Areal S1** sind in Höhe von L V einige Somata von Pyramidenneuronen NF-positiv. Die übrigen Schichten enthalten keine weiteren markierten Zellen.

Das **Areal A1** zeigt wie die Areale M1 und S1 in Höhe von Schicht V einen schmalen Horizont von NF+-positiven großen Pyramidenneuronen. Auch in diesem Areal weisen die übrigen Kortexschichten kein Labeling auf.

Im visuellen **Areal V1** sind ebenfalls nur in Schicht V einige schattenhafte NF+-Zellen zu erkennen. Allerdings ist die Intensität der Immunmarkierung im Vergleich mit derjenigen in den Regionen M1, S1 und A1 hier nur recht schwach. In den übrigen Kortexschichten sind wiederum keine weiteren eindeutig markierten Somata zu erkennen.



### Schwein:

Diese Spezies zeigt bei immunhistochemischer Testung auf Anti-Neurofilament folgende Ergebnisse (vgl. Abb. 3.5-21):

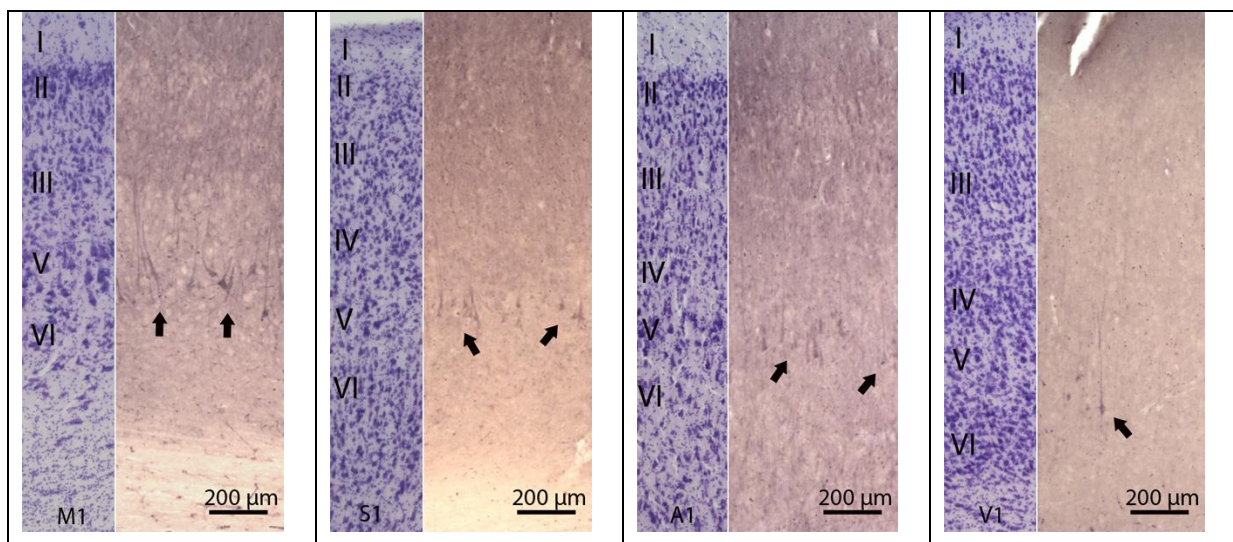
Das **Areal M1** zeigt wiederum einen im Wesentlichen einschichtigen Horizont mit hier deutlich markierten, großen Pyramidenzellen in Höhe von Schicht V. Bei diesen Zellen sind die dreieckigen Somata und die Anfangsabschnitte der Apikaldendriten gut zu erkennen. Die gelabelten Perikaryen scheinen in Form und Größe denen der

nebenstehenden „Geschwisterneuronen“ (Nissl-Präparat) vergleichbar. In den übrigen Schichten sind keine weiteren immun-markierten Perikaryen zu finden.

Im **Areal S1** zeigen sich einige NF+ -Somata ebenfalls auf Höhe von Schicht V schwach, aber spezifisch gelabelt. [Dafür spricht, einmal abgesehen von der gemeinsamen Form und Topographie innerhalb der Hirnrinde (Areale M1-V1), bei den mehr oder minder deutlich dargestellten Perikaryen für eine echte Immunmarkierung, dass die zugehörigen Schnitte im Labor parallel prozessiert und identisch behandelt wurden.] Und auch diese Neuronen passen größenmäßig gut zu den „Geschwisterpyramiden“ in L V der Nissl-Färbung. Weiteres spezifisches Labeling ist in den übrigen Schichten von Areal S1 nicht offensichtlich.

Auch im **Areal A1** finden sich einige NF-ir Neuronen in Höhe von Schicht V. Die dreieckigen Zellleiber dieser Pyramidenzellen mit den charakteristischen Apikaldendriten sind schwach, aber eindeutig erkennbar, wobei die Form der Somata hier noch etwas schlanker ist als bei denen in Areal S1.

Das **Areal V1** zeigt NF+ -Neuronen in der Tiefe von Schicht V, am Übergang zu Schicht VI. Hier sind vereinzelt große, schwach dreieckige Somata (Pfeil) mit einem schlanken, senkrecht orientierten Apikaldendriten erkennbar. In den übrigen Kortexschichten finden sich wiederum keine weiteren gelabelten Perikarya.



### 3.5-21: Neurofilament- positive Neuronen im Kortex des Schweines.

Die NF+ -markierten Zellen (jeweils durch Pfeile gezeigt) sind hauptsächlich im Zentrum von Schicht V (in M1, S1 und A1), oder (in V1) noch tiefer am Übergang LV-LVI zu erkennen. Im Areal M1 sind die NF+ -Zellen mit Blick auf das nebenstehende Nissl-Zellbild eindeutig als große Pyramidenzellen einzuordnen. Auch in den übrigen Arealen deuten die meist dreieckigen Zellleiber und die nach oben abgehenden Apikaldendriten jeweils auf Pyramidenzellen hin. In den übrigen Kortexschichten sind arealübergreifend keine weiteren NF+ -Neuronen erkennbar. Für Details s. Text.



### Schaf:

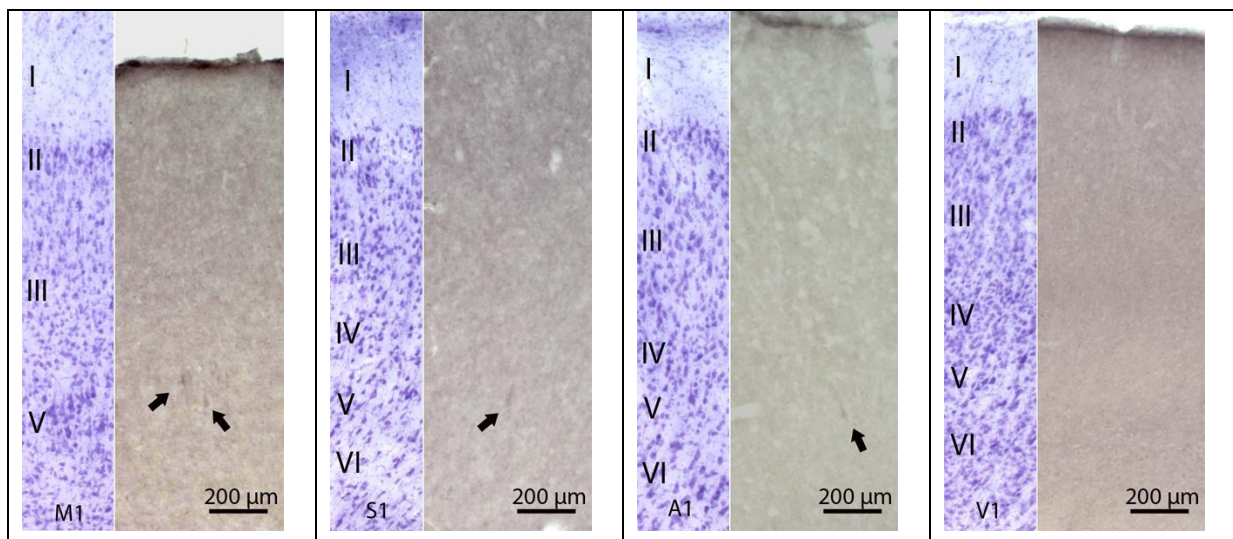
Der Kortex des Schafes zeigt bei der immunhistochemischen Testung mit dem Antikörper gegen Neurofilament ein schwach ausgeprägtes Labeling (vgl. Abb. 3.5-22):

Im **Areal M1** liegen in Schicht V einzelne schwach markierte Somata (Pfeile). Dabei lassen das dreieckige Perikaryon und der proximale Abschnitt des Apikaldendriten auf eine schattenhafte, aber vermutlich spezifische NF+-Markierung von Pyramidenzellen schließen. In den übrigen Kortexschichten sind keine NF-positiven Zellleiber zu erkennen.

Das **Areal S1** zeigt im Mikroskop sehr wenige und vereinzelt, spärlich gelabelte Zellen in Höhe von Schicht V. Das Soma und der Abgang des Apikaldendriten sind hierbei nur schwach vom unspezifischen Hintergrund zu unterscheiden. In den übrigen Schichten sind auch hier keine NF-positiven Perikarya zu erkennen.

Im **Areal A1** finden sich wiederum nur einige wenige, vereinzelt und schwach markierte Zellen auf Höhe von Schicht V. Auch hier sind der schmale Zellleib und Apikaldendrit nur schwer von der Hintergrundfärbung zu unterscheiden. Die übrigen Schichten dieses Kortexareals zeigen keine NF-positiven Somata.

Im Gegensatz hierzu findet man im **Areal V1** in keiner Schicht spezifisch gegen Neurofilament gelabelte Neuronen.



**Abb. 3.5-22: Neurofilament-positive Neuronen im Kortex des Schafes.**

Die Markierung zeigt bei diesem Tier insgesamt eine relativ geringe Intensität. Einzelne NF-markierte Neuronen (Pfeile) sind einzig in der Schicht V der Areale M1, S1 und A1 schwach zu erkennen. Im primär-visuellen Areal V1 finden sich keinerlei spezifisch gefärbte Neuronen. Für Details s. Text.

### Hund:

Beim Hund ergibt die immunhistochemische Bearbeitung der untersuchten Kortextareale folgendes Ergebnis (vgl. Abb. 3.5-23): Auch hier kommt es nur zum spezifischen Labeling einzelner besonders großer Neuronen, welche sich bei allen Arealen im Kaliber gut entsprechen.

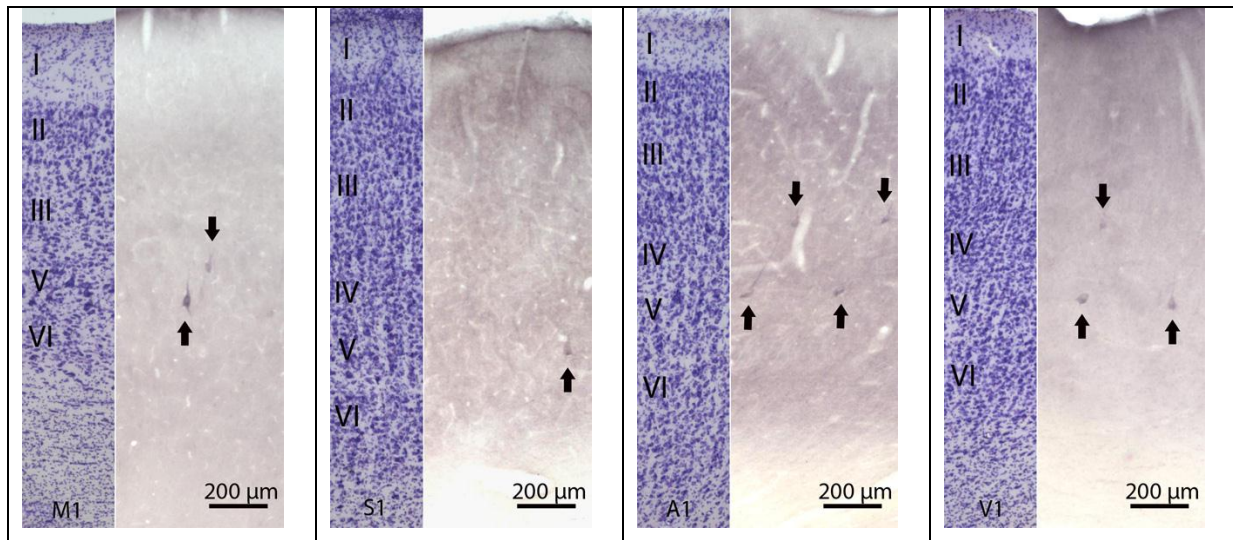
Im **Areal M1** sind einzelne immunpositive Neuronen in Höhe von Schicht III (kleineres Soma am Unterrand) und Schicht V (großes Soma) deutlich zu erkennen. Die großen Pyramidenzellen in Schicht V besitzen ein charakterisches Perikaryon, einen nach oben abgehenden starken Apikaldendriten sowie Andeutungen weiterer Dendriten. Sie passen morphologisch und im Kaliber gut zu den großen Pyramidenzellen in Schicht V des begleitenden Nissl-Bildes. Die übrigen Kortextschichten von M1 enthalten dagegen keine NF-positiven Perikarya.

In **Areal S1** zeigen sich einzelne schwach markierte Zellen in Schicht V. Auch sie besitzen ein für Pyramidenzellen typisches dreieckiges Soma und einen nach oben orientierten Apikaldendriten sowie Andeutungen weiterer Dendriten. Die übrigen Kortextschichten von S1 enthalten ebenfalls keine NF-positiven Somata.

Im **Areal A1** finden sich sowohl in Schicht III (nur im unteren Abschnitt) als auch in Schicht V einige NF+- markierte Neuronen. Auch sie sind morphologisch jeweils als Pyramidenzellen zu erkennen. In den übrigen Kortextschichten zeigen sich dagegen keine NF-positiven Perikarya.

Auch das **Areal V1** enthält markierte Zellen ausschließlich in den Kortextschichten III (hier nur im unteren Anteil) und V. Diese Neuronen sind ebenfalls als typische Pyramidenzellen einzuordnen. Die übrigen Schichten sind beim Hund wie in den anderen Kortextarealen frei von NF- positiven Somata.





**Abb. 3.5-23: Neurofilament- positive Neuronen im Kortex des Hundes.**

Die NF-gelabelten Zellen (Pfeile in M1, S1, A1 und V1) sind jeweils in Schicht V und Schicht III (nur in M1, A1 und V1) des Kortex zu finden. Morphologisch entsprechen die NF-positiven Somata dem Typus der Pyramidenzelle: dreieckiger Zelleib und Apikaldendrit sowie weitere basale Dendriten (unterer Pfeil in M1). Für Details s. Text.

### **Gorilla:**

Bei diesem Menschenaffen ergibt die Immunreaktion gegen das Strukturprotein Neurofilament (NF) folgendes Ergebnis (vgl. Abb. 3.5-24):

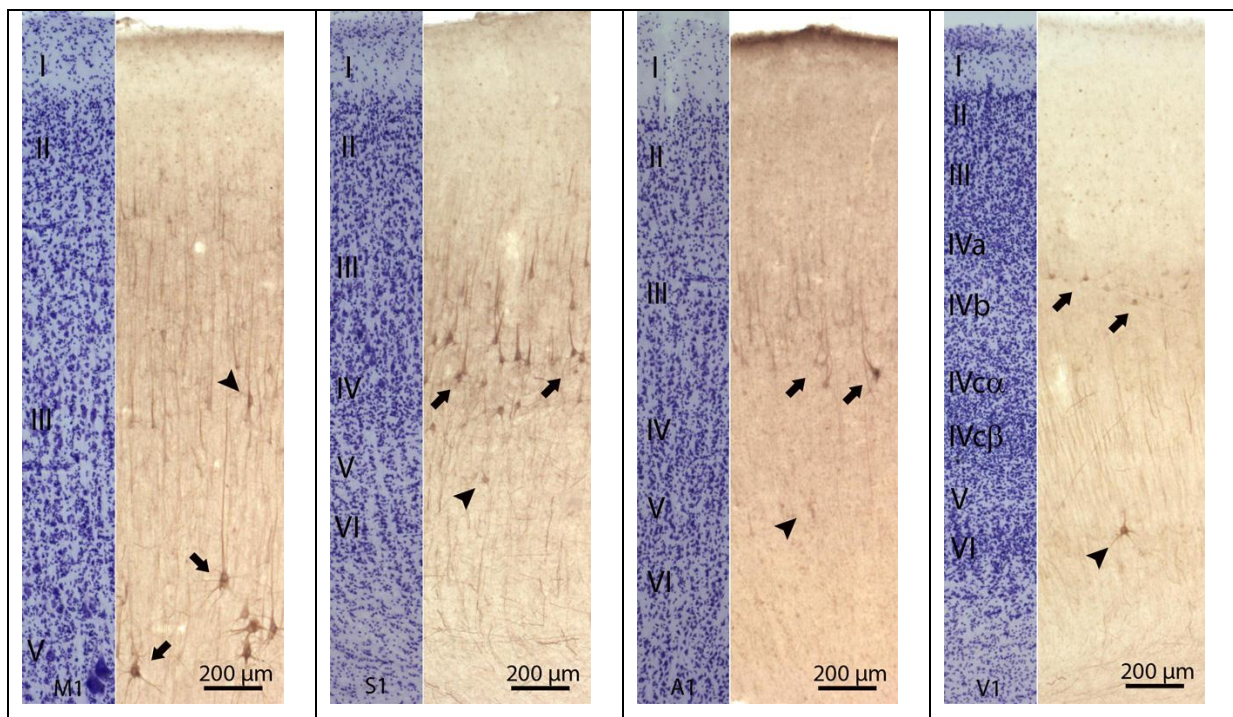
im **Areal M1** sind auf eindrucksvolle Weise eine Reihe von Anti-Neurofilament-markierten Neuronen in Schicht V dargestellt (Pfeile). Die Somata dieser Pyramidenzellen und ihre Fortsätze (ein Apikal- und mehrere Basaldendriten) sind intensiv gefärbt. Sie gehören zu den Riesenpyramidenzellen, auch wenn im begleitenden Nissl-Zellbild vereinzelt erheblich größere Betzsche Zellen dargestellt sind (ganz links ganz unten in Abb. 3.5-24). Die Apikaldendriten steigen senkrecht in Richtung der pialen Kortexoberfläche auf und sind hierbei teilweise über eine beträchtliche Distanz zu verfolgen. Darüberhinaus findet sich in Schicht III eine Anzahl kleinerer NF+ -Pyramidenzellen mit ebenfalls deutlichem Labeling (Pfeilspitze). Die übrigen Kortex-Schichten von M1 weisen keine eindeutig spezifische Immunreaktion auf.

Im **Areal S1** ist eine Vielzahl markierter Zellen (Pfeile) vornehmlich in der unteren Zone von Schicht III zu finden. Auch hier handelt es sich um typische Pyramidenzellen. Zusätzlich befinden sich unmittelbar darunter in Schicht IV und in geringem Maße auch in Schicht V (am Übergang zu Schicht VI) einzelne kleinere NF+ -Neuronen (Pfeilspitze), welche nur bedingt pyramidalen und möglicherweise

sogar stattdessen eher multipolaren Charakter aufweisen. Die übrigen Kortexschichten dagegen scheinen mehr oder minder frei von NF+- Somata.

Im **Areal A1** sind die NF+ -Zellen wiederum hauptsächlich in der unteren Hälfte von Schicht III lokalisiert (Pfeile). Auch hierbei handelt es sich um typische, wenn auch deutlich kleinere Pyramidenzellen als jene in den Arealen M1 und S1. Zusätzlich befinden sich vereinzelt schwach gelabelte NF-positive Zellleiber in Höhe von L V (Pfeilspitze). Die übrigen Schichten sind frei von NF+ -Somata.

Das **Areal V1** enthält NF- positive Zellen größtenteils am Oberrand von Schicht IVb. Die markierten Zellen wirken hierbei relativ klein. Zusätzlich findet man am Übergang zwischen Schicht V und VI vereinzelt relativ große, eher multipolar anmutende Perikarya von NF+ -Neuronen. Sie besitzen deutlich gelabelte Somata und Fortsätze. Demgegenüber sind die übrigen Kortexschichten offenbar frei von NF+- Somata.



**Abb. 3.5-24: Neurofilament- positive Zellen im Kortex des Gorillas.**

Beispiele für NF+ -markierte Somata von Neuronen sind vornehmlich in Schicht V zu finden (besonders in M1, Pfeile). Sie sind deutlich gelabelt und passen größtmäßig am besten zu den Riesenpyramidenzellen des begleitenden Nissl-Zellbildes (linker Bildteil von M1). In Schicht III sind ebenfalls Beispiele für NF+ -positive Zellen zu finden (Pfeile in S1-V1), wobei deren pyramidaler Charakter nicht immer eindeutig vom multipolaren Typ abgrenzbar scheint. In Areal V1 sind die gelabelten Somata der Pyramidenzellen recht klein und befinden sich meist in den oberen Abschnitten von Schicht IVb (Pfeile). Zusätzlich sind hier am Übergang zwischen L V und L VI vereinzelt weitere deutlich gelabelte Perikarya von NF+- Neuronen vorhanden (Pfeilspitze). Etwas weniger deutlich scheinen solche Zellen in S1 und A1 (Pfeilspitzen). Für Details s. Text.

### **Mensch:**

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Kortexprouben des Menschen ergibt die immunistochemische Bearbeitung mit dem Antikörper Anti-Neurofilament ein dem Gorilla größtenteils ähnliches, wenn auch deutlich schwächer ausgeprägtes Bild (vgl. Abb. 3.5-24, 3.5-25).

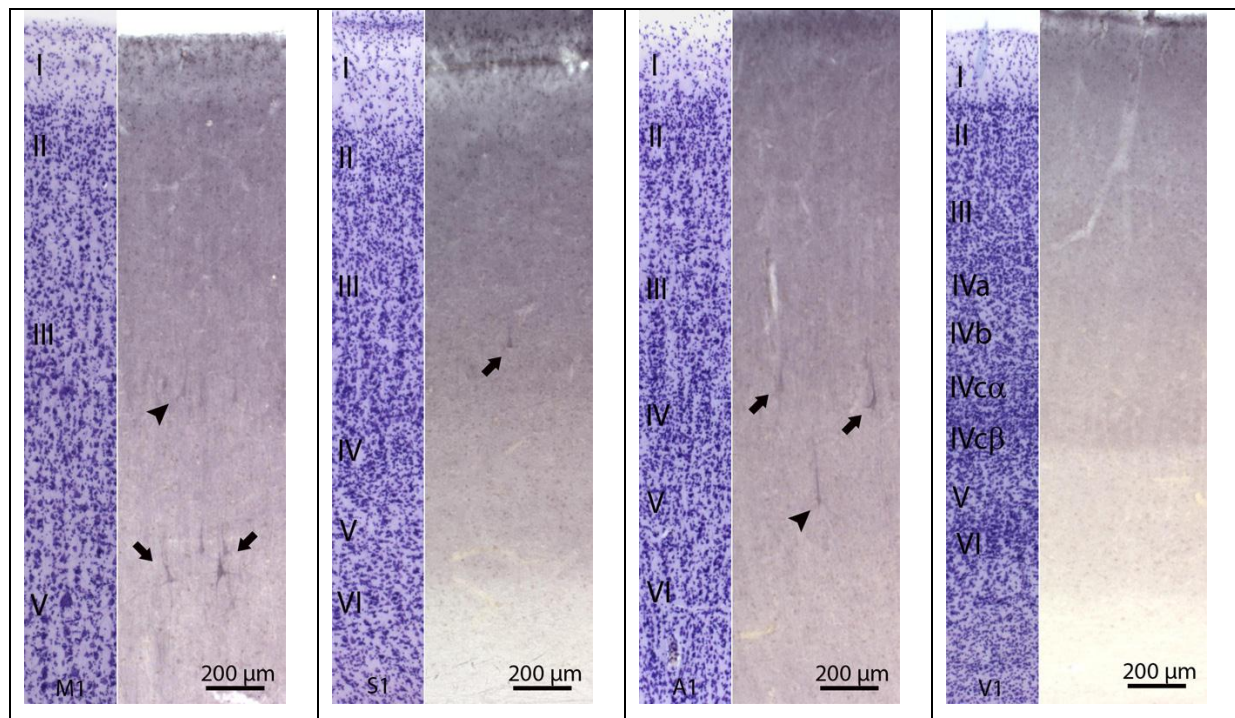
Im **Areal M1** befinden sich einige große Perikarya von NF+- Pyramidenzellen in Schicht V, welche jedoch nicht so groß und markant gelabelt sind wie beim Gorilla. Auch diese gelabelten Zellen wirken kleiner als die (hier ebenfalls kleineren) Betz-Zellen im begleitenden Nissl-Bild (linke untere Bildhälfte). Darüberhinaus sind einzelne kleinere Pyramidenzellen schattenhaft in den unteren Abschnitten von Schicht III zu erkennen. Die übrigen Rindenschichten dagegen zeigen keinerlei Hinweis auf Immunreaktivität gegen Neurofilament.

Im **Areal S1** finden sich einzelne kleinere Pyramidenzellen in der unteren Hälfte von Schicht III. Ansonsten zeigen sich in diesem Kortexareal keine weiteren NF+ - Neuronen.

Das **Areal A1** beherbergt Somata von NF+- Zellen hauptsächlich in der tiefen Schicht III am Übergang zu Schicht IV. Morphologisch lassen sich diese Zellen in die Gruppe der Pyramidenzellen einordnen. Darüberhinaus zeigen sich auch in Schicht V vereinzelt NF+ -Zellsomata samt ihrer apikalen Dendriten. Die übrigen Kortexschichten von A1 sind dagegen völlig frei von Immunreaktivität gegen Neurofilament.

Im **Areal V1** ergibt die Bearbeitung des Gewebes nach dem bewährten immunhistochemischen Protokoll keine verwertbaren Zellmarkierungen.





### 3.5-25: Neurofilament- positive Neuronen im Kortex des Menschen.

Beispiele für NF+ -markierte Zellen sind vornehmlich in Schicht V (gut erkennbar in M1) zu finden (Pfeile in M1, Pfeilspitze in A1). In M1 passen diese Neuronen größtmäßig einigermaßen zu den Riesenpyramidenzellen des begleitenden Nissl-Zellbildes (linker Bildteil von M1). In Schicht III sind teilweise ebenfalls Beispiele für NF+ -positive Zellen zu finden (Pfeilspitze in M1, Pfeile in S1 und A1). In V1 zeigt sich bei dieser Gewebeprobe keine verwertbare NF-Immuneaktivität. Für Details s. Text.

### 3.6 Stereologie: Die Neuronendichte der Schichten III und V in den Rindenarealen M1, S1, A1 und V1 bei Zahnwalen

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der stereologischen Analyse ausgewählter Rindenregionen bei zwei Zahnwal-Vertretern: dem Schweinswal und dem Großen Tümmler. Im Detail geht es dabei um die Bestimmung der Neuronendichte in den Kortexschichten III und V der vier kortikalen Primärfelder M1, S1, A1 und V1 bei beiden Spezies. Die genaue Vorgehensweise bei diesem Ansatz wird in Kapitel 2.4.2 ausführlich erläutert. Bei den bearbeiteten Tieren handelt es sich für den Schweinswal um das Exemplar # PP4417, für den Großen Tümmler um das Exemplar # TT133 (für weitere Hintergrundinformationen siehe Tab. 2.2-3).

Alle stereologischen Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung (vgl. Kap. 3.6) sind in der Originalarbeit von Kern und Kollegen (2011) bereits veröffentlicht worden.

#### 3.6.1 Schweinswal (*Phocoena phocoena*)

Die stereologische Kortexanalyse dieses kleinen Zahnwals erfolgt über die

Bestimmung und Interpretation einer ganzen Reihe von Parametern. Dabei ergibt sich die Dichte der Hirnrindenschichten über zwei Verfahren: zum einen aus der Zählung der Neuronen in der untersuchten Zielregion ("Optical Fractionator", siehe Kap. 2.4.2.2) und zum anderen aus der Ermittlung des dazugehörigen Volumens dieser Zielregion ("Cavalieri-Methode", siehe Kap. 2.4.2.3). Beide Größen zusammen (Zellzahl pro Volumeneinheit) ergeben dann letztendlich die neuronale Dichte im kortikalen Zielgebiet. In der vorliegenden Untersuchung wird die neuronale Dichte allgemein in Mio. Zellen / cm<sup>3</sup> angegeben.

Eine Auflistung der Parameter für die stereologische Analyse der Hirnrinde des Schweinswals mit Hilfe des Prinzips des "Optical Fractionator" zeigt Tabelle 3.6-1.

**Tab. 3.6-1** Parameter und Daten bei der Anwendung des "Optical Fractionator" für den Schweinswal

<u>Optical Fractionator</u>								
Kortex-Areal	<b>M1</b>		<b>S1</b>		<b>A1</b>		<b>V1</b>	
Kortex-Schicht	III	V	III	V	III	V	III	V
Eingestellte Schnittdicke am Mikrotom (d) [µm]	60	60	60	60	60	60	60	60
Gesamtzahl der Schnitte durch das Areal	109	109	104	104	107	107	105	105
Anzahl der untersuchten Schnitte	10	10	10	10	10	10	10	10
Schnittperiodizität (p)	10	10	10	10	10	10	10	10
Section sampling fraction (SSF)	1/ 10	1/ 10	1/ 10	1/ 10	1/ 10	1/ 10	1/ 10	1/ 10
<b>1 / SSF</b>	10	10	10	10	10	10	10	10
Zählrahmen in X-Achse (X-ZR) [µm]	60	60	60	60	60	60	60	60
Zählrahmen in Y-Achse (Y-ZR) [µm]	60	60	60	60	60	60	60	60
Fläche des Zählrahmens [µm <sup>2</sup> ]	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600
Gitternetzkästchen in X-Achse (X-GK) [µm]	1.100	800	1.200	800	1.700	1.000	1.200	500
Gitternetzkästchen in Y-Achse (Y-GK) [µm]	900	800	1.100	700	900	400	1.300	600
Fläche des Gitternetzkästchens [µm <sup>2</sup> ]	990.000	640.000	1.320.000	560.000	1.530.000	400.000	1.560.000	300.000
Area sampling fraction (ASF)	0,0036	0,0056	0,0027	0,0064	0,0024	0,0090	0,0023	0,0120
<b>1 / ASF</b>	275,0000	177,7778	366,6667	155,5556	425,0000	111,1111	433,3333	83,3333
Disektor-Höhe (DH) [µm]	28	28	28	28	28	28	28	28



Top guard ( <b>TG</b> ) [μm]	1	1	1	1	1	1	1	1
Bottom guard ( <b>BG</b> ) [μm]	1	1	1	1	1	1	1	1
Mittlere gemessene Schnittdicke ( <b>MGS</b> ) [μm]	30,4	30,5	30,4	30,3	30,5	30,4	30,2	30,2
Thickness sampling fraction ( <b>TSF</b> )	0,9211	0,9180	0,9211	0,9241	0,9180	0,9211	0,9272	0,9727
<b>1 / TSF</b>	1,0857	1,0893	1,0857	1,0821	1,0893	1,0857	1,0786	1,0786
Summe der Zähleinheiten ( <b>Σn</b> )	502	405	540	414	638	509	636	523
Fehlerkoeffizient ( <b>CE</b> )	0,042	0,042	0,032	0,038	0,026	0,036	0,026	0,031
Neuronenzahl der Zielregion ( <b>N<sub>total</sub></b> )	1.497.372	783.265	2.150.556	697.603	2.952.528	613.365	2.970.805	469.727

Letztendlich ergibt die Bearbeitung der Rindenfelder M1, S1, A1 und V1 für die Schichten III und V der Zielregionen folgende Neuronenzahlen (Tabelle 3.6-1, letzte Zeile):

- M1, Schicht III:	1.497.372	- M1, Schicht V:	783.265
- S1, Schicht III:	2.150.556	- S1, Schicht V:	697.603
- A1, Schicht III:	2.952.528	- A1, Schicht V:	613.365
- V1, Schicht III:	2.970.805	- V1, Schicht V:	469.727

Um nun für die bisher rein numerisch (also die Zellzahl betreffend) untersuchte Kortex-Zielregion das jeweils zugehörige Volumen zu ermitteln, kommt die sogenannte "Cavalieri-Methode" zur Anwendung (Genaueres zu dieser Methodik s. Kap. 2.4.2.3).

In Tabelle 3.6-2 sind alle Parameter und Daten gezeigt, die diese Methode verwendet bzw. liefert.

**Tab. 3.6-2** Parameter und Daten bei der Anwendung der "Cavalieri- Methode" für den Schweinswal

<u>Cavalieri- Methode</u>								
Kortex-Areal	<b>M1</b>		<b>S1</b>		<b>A1</b>		<b>V1</b>	
Kortex-Schicht	III	V	III	V	III	V	III	V
Eingestellte Schnitt- dicke am Mikrotom ( <b>d</b> ) [μm]	60	60	60	60	60	60	60	60
Gesamtzahl der Schnitte durch das Areal	109	109	104	104	107	107	105	105
Anzahl der untersuchten Schnitte	10	10	10	10	10	10	10	10
Schnitt- periodizität ( <b>p</b> )	10	10	10	10	10	10	10	10

Kantenlänge eines Gitternetzkästchens [ $\mu\text{m}$ ]	175	125	175	125	225	100	150	75
Fläche eines Gitternetzkästchens ( $k$ ) [ $\mu\text{m}^2$ ]	30.625	15.625	30.625	15.625	50.625	10.000	22.500	5.625
Summe der Zähleinheiten ( $\Sigma n$ )	6.290	4.449	7.144	4.402	4.434	6.179	8.858	7.527
Volumen der Zielregion ( $V_{\text{Roi}}$ ) [ $\cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ]	1.155.790	417.094	1.312.710	412.687	1.346.830	370.740	1.195.830	254.036

Als Ergebnis liefert die "Cavalieri-Methode" für die Kortex-Schichten III und V der jeweils untersuchten Zielregionen nachfolgende Volumenwerte in  $\mu\text{m}^3$  ( $\cdot 10^5$ , vgl. Tab. 3.6-2, letzte Zeile). In Tab. 3.6-2 sind die 13- oder 14-stelligen Endergebnisse der letzten Zeile zur besseren Übersichtlichkeit um diesen 6-stelligen Faktor " $\cdot 10^5$ " vorvereinfacht, der auch in der Spalte ganz links unten vermerkt ist.

- M1, Schicht III:	1.155.790	- M1, Schicht V:	417.094
- S1, Schicht III:	1.312.710	- S1, Schicht V:	412.687
- A1, Schicht III:	1.346.830	- A1, Schicht V:	370.740
- V1, Schicht III:	1.195.830	- V1, Schicht V:	254.036

Aus beiden Wertepaaren (Neuronenzahl und Volumen) einer jeweiligen Zielregion lässt sich anschließend die zugehörige Neuronendichte berechnen.

Hierfür teilt man die Neuronenzahl durch das jeweilige Volumen der Zielregion:

$$\text{Neuronendichte} = \text{Neuronenzahl der Zielregion } [N_{\text{total}}] / \text{Volumen der Zielregion } [V_{\text{Roi}}]$$

Tabelle 3.6-3 zeigt in Übersichtsform die jeweiligen Neuronenzahlen (s. Tab. 3.6-1, letzte Zeile) sowie die Volumina (s. Tab. 3.6-2, letzte Zeile) und die daraus resultierenden Neuronendichten der untersuchten Schichten III und V der Areale M1, S1, A1 und V1 des Schweinswals PP4417.

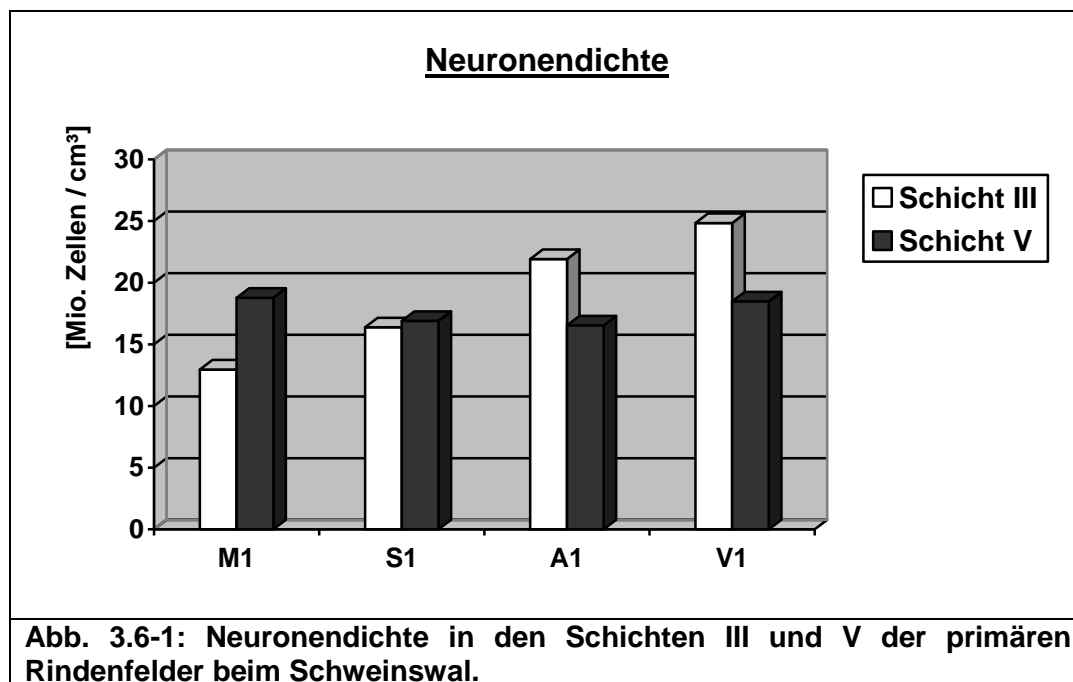
**Tab. 3.6-3** Neuronendichte beim Schweinswal

Kortex-Areal	M1		S1		A1		V1	
Kortex-Schicht	III	V	III	V	III	V	III	V
Neuronenzahl der Zielregion ( $N_{\text{total}}$ )	1.497.372	783.265	2.150.556	697.603	2.952.528	613.365	2.970.805	469.727
Volumen der Zielregion ( $V_{\text{Roi}}$ ) [ $\cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ]	1.155.790	417.094	1.312.710	412.687	1.346.830	370.740	1.195.830	254.036
<b>Neuronendichte</b> [ $\cdot 10^6$ Zellen / $\text{cm}^3$ ]	<b>12,96</b>	<b>18,78</b>	<b>16,38</b>	<b>16,90</b>	<b>21,92</b>	<b>16,54</b>	<b>24,84</b>	<b>18,49</b>

Als Endergebnis der stereologischen Analyse der Hirnrindenschichten III und V bei den primären Rindenfeldern M1, S1, A1 und V1 des Schweinswals # PP4417 ergeben sich für die Neuronendichte also folgende Ergebnisse. Für die Werte wurde jeweils berücksichtigt, dass für die Umrechnung von  $\mu\text{m}^3$  in  $\text{cm}^3$  ein Faktor von " $10^{-12}$ " miteinbezogen werden muss. Anschließend wurde diesen 8-stelligen Ergebnissen zur Übersichtlichkeit der Faktor " $* 10^6$ " vorangestellt (in Tab. 3.6-3 ganz links unten vermerkt). So werden die Endergebnisse angegeben als Mio. Zellen /  $\text{cm}^3$ ; s.Tab. 3.6-3, letzte Zeile):

- M1, Schicht III:	12,96	- M1, Schicht V:	18,78
- S1, Schicht III:	16,38	- S1, Schicht V:	16,90
- A1, Schicht III:	21,92	- A1, Schicht V:	16,54
- V1, Schicht III:	24,84	- V1, Schicht V:	18,49

Abbildung 3.6-1 soll als graphische Zusammenfassung der Ergebnisse beim Schweinswal dienen; sie zeigt die jeweiligen Neuronendichten in den Schichten III und V der Zielregionen M1, S1, A1 und V1 im Vergleich.



### 3.6.2 Großer Tümmler (*Tursiops truncatus*)

Die stereologische Analyse der Hirnrinde (Neuronendichte der Schichten III und V in den primären Rindenfeldern M1, S1, A1 und V1) erfolgt beim Großen Tümmler identisch zu dem in Kap. 3.6.1 beschriebenen Procedere beim Schweinswal. Dafür

wird hier wiederum zunächst die reine Zahl der Neuronen in der untersuchten Zielregion ermittelt (Optical Fractionator), anschließend erfolgt die Bestimmung des dazugehörigen Volumens dieser Zielregion (Cavalieri-Methode) und aus den beiden Wertereihen ergibt sich jeweils die Zelldichte im Gewebe:

$$\text{Neuronendichte} = \text{Neuronenzahl der Zielregion } [N_{\text{total}}] / \text{Volumen der Zielregion } [V_{\text{ROI}}]$$

Bei der Anwendung des “Optical Fractionator” ergeben sich analog zum Schweinswal eine Vielzahl an Parametern und Daten, welche in Tabelle 3.6-4 zusammengefasst sind.

**Tab. 3.6-4** Parameter und Daten bei der Anwendung des “Optical Fractionator” für den Großen Tümmler

<u>Optical fractionator</u>								
Kortex-Areal	<b>M1</b>		<b>S1</b>		<b>A1</b>		<b>V1</b>	
Kortex-Schicht	III	V	III	V	III	V	III	V
Eingestellte Schnittdicke am Mikrotom (d) [µm]	60	60	60	60	60	60	60	60
Gesamtzahl der Schnitte durch das Areal	68	68	83	83	109	109	104	104
Anzahl der untersuchten Schnitte	6	6	8	8	10	10	10	10
Schnittperiodizität (p)	10	10	10	10	10	10	10	10
Section sampling fraction (SSF)	1/ 10	1/ 10	1/ 10	1/ 10	1/ 10	1/ 10	1/ 10	1/ 10
1 / SSF	10	10	10	10	10	10	10	10
Zählrahmen in X-Achse (X-ZR) [µm]	60	60	60	60	60	60	60	60
Zählrahmen in Y-Achse (Y-ZR) [µm]	60	60	60	60	60	60	60	60
Fläche des Zählrahmens [µm <sup>2</sup> ]	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600
Gitternetzkästchen in X-Achse (X-GK) [µm]	1.000	800	1.700	900	1.500	800	1.100	700
Gitternetzkästchen in Y-Achse (Y-GK) [µm]	800	700	1.200	600	1.300	500	1.300	800
Fläche des Gitternetzkästchens [µm <sup>2</sup> ]	800.000	560.000	2.040.000	540.000	1.950.000	400.000	1.430.000	560.000
Area sampling fraction (ASF)	0,0045	0,0064	0,0018	0,0067	0,0018	0,0090	0,0025	0,0064
1 / ASF	222,2222	155,5556	566,6667	150,0000	541,6667	111,1111	397,2222	155,5556

Disektor-Höhe (DH) [μm]	28	28	28	28	28	28	28	28
Top guard (TG) [μm]	1	1	1	1	1	1	1	1
Bottom guard (BG) [μm]	1	1	1	1	1	1	1	1
Mittlere, gemessene Schnittdicke (MGS) [μm]	34,8	34,3	33,2	32,8	31,5	30,9	31,1	31,3
Thickness sampling fraction (TSF)	0,8045	0,8163	0,8434	0,8537	0,8889	0,9061	0,9003	0,8946
1 / TSF	1,2429	1,2250	1,1857	1,1714	1,1250	1,1036	1,1107	1,1179
Summe der Zähleinheiten (Σn)	672	318	520	429	786	787	1002	538
Fehlerkoeffizient (CE)	0,040	0,048	0,045	0,048	0,034	0,031	0,033	0,035
Neuronenzahl der Zielregion (N <sub>total</sub> )	1.855.529	606.007	3.494.258	753.960	4.793.753	965.593	4.418.817	936.684

Die Anwendung des “optical fractionator” liefert somit insgesamt folgende Zellzahlen für die einzelnen Zielregionen (s. Tab. 3.6-4, letzte Zeile):

- M1, Schicht III:	1.855.529	- M1, Schicht V:	606.007
- S1, Schicht III:	3.494.258	- S1, Schicht V:	753.960
- A1, Schicht III:	4.793.753	- A1, Schicht V:	965.593
- V1, Schicht III:	4.418.817	- V1, Schicht V:	936.684

Anschließend werden wiederum für die bisher numerisch untersuchten Gebiete die dazugehörigen Volumina bestimmt. Hierbei kommt, wie oben beschrieben, die “Cavalieri-Methode” zur Anwendung. Tabelle 3.6-5 zeigt die einzelnen Parameter und Daten.

**Tab. 3.6-5** Parameter und Daten bei Anwendung der “Cavalieri- Methode” auf den Großen Tümmler

<b>Cavalieri-Methode</b>								
Kortex-Areal	<b>M1</b>		<b>S1</b>		<b>A1</b>		<b>V1</b>	
Kortex-Schicht	III	V	III	V	III	V	III	V
Eingestellte Schnitt- dicke am Mikrotom (d) [μm]	60	60	60	60	60	60	60	60
Gesamtzahl der Schnitte durch das Areal	68	68	83	83	109	109	104	104
Anzahl der untersuchten Schnitte	6	6	8	8	10	10	10	10
Schnitt- periodizität (p)	10	10	10	10	10	10	10	10



Kantenlänge eines Gitternetzkästchens [ $\mu\text{m}$ ]	250	175	250	175	200	125	200	100
Fläche eines Gitternetzkästchens (k) [ $\mu\text{m}^2$ ]	62.500	30.625	62.500	30.625	40.000	15.625	40.000	10.000
Summe der Zäheinheiten ( $\Sigma n$ )	2.447	1.808	4.039	2.518	6.263	5.435	4.514	5.675
Volumen der Zielregion ( $V_{\text{ROI}}$ ) [ $\cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ]	917.625	332.220	1.514.620	462.682	1.503.120	509.531	1.083.360	340.500

Beim Großen Tümmler ergibt die “Cavalieri-Methode“ demnach folgende Volumenwerte in  $\mu\text{m}^3$  für die einzelnen Zielregionen ( $\cdot 10^5$ , wie beim Schweinswal sind die 13- oder 14-stelligen Endergebnisse der letzten Zeile zur besseren Übersichtlichkeit um diesen 6-stelligen Term “ $\cdot 10^5$ “ vorvereinfacht, der in Tab. 3.6-5 in der Spalte ganz links unten vermerkt ist; s. Tab. 3.6-5, letzte Zeile):

- M1, Schicht III:	917.625	- M1, Schicht V:	332.220
- S1, Schicht III:	1.514.620	- S1, Schicht V:	462.682
- A1, Schicht III:	1.503.120	- A1, Schicht V:	509.531
- V1, Schicht III:	1.083.360	- V1, Schicht V:	340.500

Nach der Ermittlung der Zellzahl und des dazugehörigen Volumens erfolgt als letzter Schritt die Bestimmung der jeweiligen Zelldichten in den untersuchten Arealen. Wie bereits oben erwähnt wird die Neuronendichte der Zielregion durch Division der Zellzahl durch das dazugehörige Volumen berechnet:

$$\text{Neuronendichte} = \text{Neuronenzahl der Zielregion } [N_{\text{total}}] / \text{Volumen der Zielregion } [V_{\text{ROI}}]$$

Abschließend fasst Tabelle 3.6-6 die jeweiligen Zellzahlen, Volumina und Neuronendichten in den untersuchten Zielregionen zusammen.

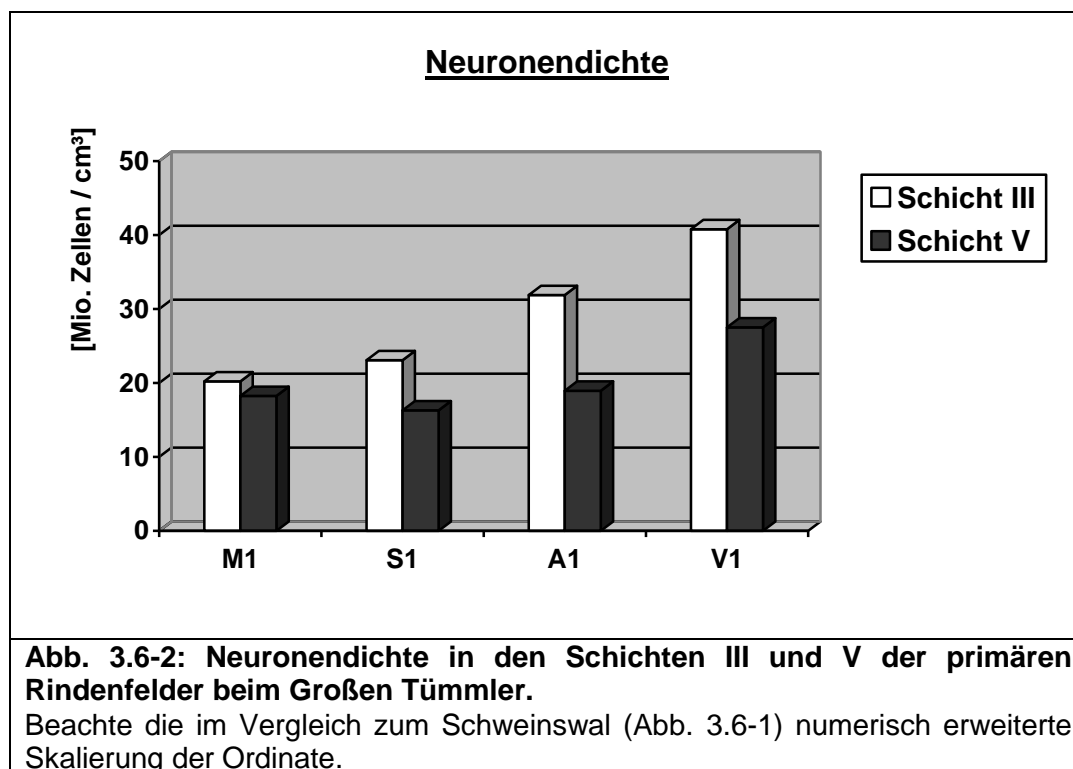
**Tab. 3.6-6** Neuronendichte beim Großen Tümmler

Kortex-Areal	M1		S1		A1		V1	
Kortex-Schicht	III	V	III	V	III	V	III	V
Neuronenzahl der Zielregion ( $N_{\text{total}}$ )	1.855.529	606.007	3.494.258	753.960	4.793.753	965.593	4.418.817	936.684
Volumen der Zielregion ( $V_{\text{ROI}}$ ) [ $\cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ ]	917.625	332.220	1.514.620	462.682	1.503.120	509.531	1.083.360	340.500
<b>Neuronendichte</b> [ $\cdot 10^6$ Zellen / $\text{cm}^3$ ]	<b>20,22</b>	<b>18,24</b>	<b>23,07</b>	<b>16,30</b>	<b>31,89</b>	<b>18,95</b>	<b>40,79</b>	<b>27,51</b>

Als Endresultat ergeben sich beim Großen Tümmler # TT133 auf diese Weise folgende Neuronendichten für die einzelnen Zielregionen. Für die Werte wurde analog zum Schweinswal jeweils berücksichtigt, dass für die Umrechnung von  $\mu\text{m}^3$  in  $\text{cm}^3$  ein Faktor von  $10^{-12}$  miteinbezogen werden muss. Anschließend wurde diesen 8-stelligen Ergebnissen zur Übersichtlichkeit der Faktor  $\cdot 10^6$  vorangestellt. Die Dichtewerte sind daher angegeben als Mio. Zellen /  $\text{cm}^3$  (s.Tab. 3.6-6, letzte Zeile):

- M1, Schicht III:	20,22	- M1, Schicht V:	18,24
- S1, Schicht III:	23,07	- S1, Schicht V:	16,30
- A1, Schicht III:	31,89	- A1, Schicht V:	18,95
- V1, Schicht III:	40,79	- V1, Schicht V:	27,51

Zusammenfassend soll Abbildung 3.6-2 eine graphische Übersicht liefern, welche die Neuronendichten in den Schichten III und V der Primärfelder des großen Tümmlers anschaulich vergleichbar werden lässt.



Eine abschließende Darstellung der stereologischen Analyse aus der vorliegenden Schrift liefert Tab. 3.6-7. Hierbei werden für spätere evolutionsbiologische Überlegungen (siehe Kap. 4.2) unterschiedliche Trends anhand von Dichteverhältnissen für Schweinswal (PP4417) und Großen Tümmler (TT133) intra- und interspezifisch herausgearbeitet:

**Tab. 3.6-7** Dichteverhältnisse bei Schweinswal PP4417 und Großem Tümmler TT133

Kortex-Areal	M1		S1		A1		V1	
Kortex-Schicht	III	V	III	V	III	V	III	V

**Neuronendichte**

<b>Schweinswal (PP4417)</b> [ * 10 <sup>6</sup> Zellen / cm <sup>3</sup> ]	<b>12,96</b> (0,69) ↓	<b>18,78</b>	<b>16,38</b> (0,97) ↔	<b>16,90</b>	<b>21,92</b> (1,33) ↑	<b>16,54</b>	<b>24,84</b> (1,34) ↑	<b>18,49</b>
<b>Gr. Tümmler (TT133)</b> [ * 10 <sup>6</sup> Zellen / cm <sup>3</sup> ]	<b>20,22</b> (1,11) ↑	<b>18,24</b>	<b>23,07</b> (1,42) ↑	<b>16,30</b>	<b>31,89</b> (1,68) ↑	<b>18,95</b>	<b>40,79</b> (1,48) ↑	<b>27,51</b>
<b>Dichte-Verhältnis TT / PP</b>	1,56	0,97	1,41	0,96	1,46	1,15	1,41	1,49

Die Zahlen in Klammern geben den Wert des Verhältnisses der Neuronendichte von Schicht III zu Schicht V in einem Areal in einer Spezies wieder, die Pfeile zeigen den dazugehörigen Trend. ↑: größer, ↔ : gleich, ↓: kleiner. Das Dichteverhältnis TT / PP bezieht sich auf eine jeweilige Schicht eines Areals, wobei PP = 1. Durchschnittswert der Dichte der Schichten III und V aller vier Areale im Schweinswal: 18, 35 Mio. Zellen / cm<sup>3</sup>, im Großen (Gr.) Tümmler: 24,62 Mio. Zellen / cm<sup>3</sup>. Aus Kern et al. (2011), modifiziert.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Struktur und Funktion der Neuhirnrinde bei Säugetieren in Abhängigkeit von deren Lebensraum, welcher u.a. über seine physikalischen Parameter die Rahmenbedingungen für die Veränderung von Arten vorgibt. Ganz allgemein gilt der Neokortex als ein biologisches System von hoher Komplexität, welches aber zugleich die Grundlage für die Vielfalt der neurobiologischen Fähigkeiten von Säugetieren darstellt. Eine Möglichkeit, dieses strukturelle Phänomen Hirnrinde besser zu begreifen, besteht darin, die verschiedenen Typen kortikaler Ausprägung miteinander zu vergleichen, d.h. die Breite seiner Anpassungen an unterschiedliche Lebensbedingungen zu erfassen. Stationen in diesem Procedere sind Überlegungen zur Schichtengliederung des Kortex, seinen Neuronenpopulationen, den immunhistochemischen Analysen sowie stereologischen Untersuchungen. Zielvorgaben sind das Verständnis des Zusammenspiels von kortikalem Input, intrinsischer Verschaltung und kortikalem Output im Sinne von adäquaten Antworten auf biologische Herausforderungen im natürlichen Lebensraum.

### 4.1 Der Vergleich von Kortex- Arealen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit grundsätzlichen Überlegungen zum Bau des Neokortex im Hinblick auf seine Funktion. Dem wurde schon bei der Auswahl des zu untersuchenden Materials insofern Rechnung getragen, als die in dieser Arbeit untersuchten Areale sich maximal voneinander unterscheiden: die Gewebeproben umfassen alle vier primären Rindenfelder im Neokortex (s. Kap. 1.5 und 2.3.1). Sie sollten sich "im Lichte der wechselseitigen Erhellung" über ihre Abweichungen vom fiktiven Bauplan der Säugetiere gewissermaßen gegenseitig erklären. Dabei nimmt die Motorik (M1) als einziges primär efferentes, also in subkortikale Regionen projizierendes Areal, eine Sonderstellung ein: ihm fehlt die Haupteingangsschicht für thalamische Information: die innere Körnerzellschicht (Schicht IV). Deshalb wird dieser Kortex typ als *agranulär* bezeichnet (s. Kap. 1.5). Bei den übrigen drei Arealen (S1, A1, V1) handelt es sich dagegen um primär afferente Zentren vor allem für thalamokortikale Zuflüsse. Ihr gemeinsames Markenzeichen besteht, zumindest was bisher gut untersuchte Landsäugetiere betrifft, in einer vierten Rindenschicht. Wegen ihrer Fülle an feinkörnigen Zellen werden diese drei Rindenfelder auch als *granulär*

bzw. *koniokortikal* bezeichnet (s. Kap. 1.5). Unter diesen primär sensorischen Arealen gilt das visuelle Areal (V1), zumindest bei Primaten, als das am höchsten differenzierte. Beim Menschen erreicht dieser Kortex eine maximal aufwendige Bauweise: er dominiert hier nicht nur in quantitativer Hinsicht über die anderen primären Areale, sondern weist neben den typischen sechs Schichten auch noch eine beeindruckende Spezialisierung seiner vierten Schicht (innere Körnerzellschicht) auf: dieselbe lässt sich in gleich vier Sub- Strata unterteilen (s. Kap. 3.1.4). Bei den beiden restlichen Arealen, den primären Rindenfeldern für Somatosensibilität (S1) und Akustik (A1) handelt es sich rein formal betrachtet (d.h. auf den gemeinsamen Bauplan der Säugetiere bezogen) um vergleichsweise eher ursprüngliche Systeme. Während also die beiden primären Rindenfelder von Motorik (M1) und Optik (V1) morphogenetisch gesehen diametral unterschiedliche kortikale Extreme darstellen, sind die beiden übrigen primären Rindenfelder (S1, A1) beim Menschen anscheinend weniger stark spezialisiert.

Der intraspezifische und interspezifische Vergleich der kortikalen Areale bei den hier untersuchten Arten erbrachte die Bestätigung der Tatsache, dass die Wältiere sich von terrestrischen Säugetieren mehr oder minder stark unterscheiden. Ein besonders offensichtlicher Gegensatz besteht zwischen Delphinen und dem Menschen und zeigt sich auch im Bau der Hirnrinde. Nach heutigem evolutionsbiologischem Verständnis sind diese gravierenden Unterschiede im Bau des Kortex damit korrelierenden Unterschieden in der Lebensweise geschuldet, d.h. biologische Anpassungen beispielsweise an einen neuen Lebensraum zeigen sich (je nach der Dramatik der ökologischen Veränderungen) unterschiedlich stark im Bau des Gehirns und damit auch des Kortex (vgl. Kap. 1.1).

#### **4.2 Der Vergleich von Delphinarten vor dem Hintergrund der Säugetiere**

In einem grundsätzlichen Vergleich wurden bei unterschiedlichen Zahnwal-Spezies die vier primären Rindenareale exemplarisch auf Charakteristika hin untersucht und mit denen von anderen ausgewählten Säugetieren verglichen. Auf diese Weise wurde der Kortex- Bauplan der Wältiere vor dem Hintergrund der Säugetiere insgesamt analysiert und interpretiert. So sollte geklärt werden, inwieweit sich innerhalb dieser Säugetiergruppen qualitative und quantitative morphologische Unterschiede des Kortex mit spezifischen Anpassungen der untersuchten Arten korrelieren lassen (vgl. Tab. 2.2-4 sowie Kern et al. 2011).



#### 4.2.1 Der kortikale Grundbauplan im Nissl-Zellbild und seine Abwandlung in verschiedenen Säugetiergruppen

Bei einer zusammenfassenden Betrachtung des Nissl-Zellbildes fallen in den unterschiedlichen Säugetierspezies bzw. ihren Ordnungen eine Reihe von Charakteristika auf:

Die oben vorgestellte Analyse der vier primären Rindenareale (M1, S1, A1 und V1) bei drei exemplarisch ausgewählten Säugetierspezies (Großer Tümmler, Schwein und Mensch) zeigt eindrücklich, dass ihnen ein gemeinsames Muster im Sinne des Säugetierbauplans nach Brodmann zugrundeliegt ("sechsschichtiger tektogenetischer Grundtypus", Brodmann 1909; vgl. Kap. 1.5 und 4.3.1). Allerdings ist dieses Grundmuster bei den verschiedenen Spezies in Anpassung an ihren Lebensraum bzw. ihre spezifische Lebensweise unterschiedlich abgewandelt. So sind beispielsweise die terrestrischen Säugetiere einander im Bau des Neokortex vergleichsweise ähnlich, während die Hirnrinde der Wätiere (Cetacea: Wale, Delphine, Schweinswale) in vielen Aspekten deutlich abweicht.

Folgende gewissermaßen "generaltypischen" *Kortex*- Charakteristika können (soweit bekannt) für die Säugetiere insgesamt angenommen werden und sind in verschiedenen Stammlinien mehr oder minder starken Abwandlungen unterworfen: die *Sechsschichtigkeit des Neokortex* mit der typischen Abfolge (Molekularis- äussere Körnerschicht - äussere Pyramidenschicht - innere Körnerschicht - innere Pyramidenschicht- multiforme Schicht); sein Aufbau aus *radiär orientierten Modulen* bzw. Kolumnen; die Möglichkeit der Spezialisierungen durch die Unterteilung von Schichten in *sublayers*, welche beispielsweise unterschiedliche Kaliber von Neuronen umfassen können; die *Agranularität*, d.h. das Fehlen der Schicht IV in der primär-motorischen Rinde (M1), gepaart mit dem Auftreten von sehr großen bis riesigen Pyramidenzellen (Betzsche Zellen) in der Schicht V; der charakteristische kolumnäre Bau der primär-akustischen Rinde (A1) als sogenannte "*Regenschauerformation*" (raindrop pattern, s.u.), besonders gut erkennbar bei Primaten; sowie ein Trend zur Erhöhung der Packungsdichte der Neuronen und ihrer *Miniaturisierung* in koniokortikalen Rindengebieten von Landsäugetern, vorwiegend in der Schicht IV von V1 bei visuell orientierten Spezies von Huftieren, aber vor allem bei Primaten inklusive des Menschen.

Neben diesen ordnungsübergreifenden Aspekten finden sich aber - wie oben bereits angedeutet – in jeder Tiergruppe auch eine Reihe von Charakteristika, die ganz spezifisch auf die jeweilige Säugerordnung zutreffen:

So zeigen die im Zentrum dieser Arbeit stehenden **Delphine** eine besonders beeindruckende Zytoarchitektonik: über alle zugehörigen Spezies hinweg ist ihr Kortex durch ein arealübergreifendes (also in M1, S1, A1 und V1 gleichermaßen vorhandenes) Muster gekennzeichnet, welches in den genannten Arealen nur mehr oder minder geringfügig abgewandelt ist. In den meisten der bisherigen Arbeiten wurde dieses Phänomen mit den Begriffen „Uniformität“ und „Monotonie“ beschrieben und teilweise als „primitiv“ angesehen (Kruger 1966; Kesarev 1970, 1971; Morgane und Jacobs 1972; Preobraschenskaja et al. 1973; Kesarev et al. 1977; Bullock und Gurevich 1979; Morgane et al. 1986a, 1986b; Glezer et al. 1988; Preuss 1995; Glezer 2002; Oelschläger und Oelschläger 2002; Oelschläger 2008; Kern et al. 2009). Demnach zeigt der Kortex in allen für diese Arbeit untersuchten primären Hirnrindenarealen der Delphine eine im Allgemeinen nur schwach ausgeprägte Schichtung (Laminierung), ist durchweg relativ zellarm und lässt darüberhinaus die folgenden zytoarchitektonischen Charakteristika erkennen:

Einer konstant relativ breiten, aber zellarmen *Lamina molecularis* (Schicht I oder L I) folgt in die Tiefe des Kortex stets eine schmale *Lamina granularis externa* (Schicht L II), welche durch viele dicht gepackte kleine Pyramidenneuronen gebildet wird. Die folgende *Lamina pyramidalis externa* (Schicht L III) ist in allen Arealen und bei sämtlichen Delphinspezies relativ breit angelegt (mit der geringsten Breite in M1), reich an mittelgroßen Pyramidenzellen und zeigt mit zunehmender Schichtentiefe eine Größenzunahme der Somata. Im primär-motorischen Areal M1 scheint diese Schicht am wenigsten zell dicht, verglichen mit den primär-sensorischen Arealen S1, A1 und V1. Im Areal V1 tritt bei L III zur Verdichtung der Pyramidenneuronen auch eine Miniaturisierung der Zellkaliber hinzu. Eine *Lamina granularis interna* (Schicht L IV) ist interessanterweise in keinem der Areale und bei keinem der untersuchten adulten Zahnwale erkennbar. Die *Lamina pyramidalis interna* (Schicht L V) ist meist deutlich ausgeprägt (vor allem in M1 und A1) und enthält in allen Arealen teilweise sehr große Pyramidenzellen, die in den Arealen M1 oder A1 bisweilen ein Maximum an Größe erreichen. In den Arealen S1 und V1 dagegen zeigen die Pyramidenzellen in L V meist etwas kleinere Somata und übertreffen hierin nur vereinzelt die der

mittelgroßen Pyramidenzellen in Schicht III. Die stets breit angelegte *Lamina multiformis* (Schicht L VI) ist in allen Arealen und bei allen Zahnwalen relativ zell dicht und weist eine Vielzahl meist kleiner multiformer Neuronen auf (einzig im Areal A1 wirken die Somata vereinzelt relativ groß). Die Schicht erstreckt sich weitläufig in das darunterliegende Album und bleibt dabei tiefenwärts recht unscharf begrenzt.

Der Neokortex der **Zahnwale** zeigt also stets die für diese Säugetierordnung typischen Kriterien von Uniformität:

- a) das bis auf gewisse adaptiv interpretierbare Abweichungen in allen Kortexarealen prinzipiell vorhandene zytoarchitektonische Muster, sowie
- b) die Agranularität (das Fehlen einer inneren Körnerzellschicht, Lamina IV) und die Pyramidisierung (Pyramidenzellen als dominierender Zelltyp) - und zwar in allen vier untersuchten primären Hirnrindenarealen (M1, S1, A1 und V1).

Dennoch scheinen auch im Delphin-Kortex die sonst allgemein bei Landsäugetieren vorhandenen generaltypischen Charakteristika angelegt zu sein:

- i) Ein agranuläres und mit großen Pyramidenzellen in Schicht V bestücktes Areal M1,
- ii) ein angedeutetes "raindrop pattern" (vertikale, kolumnäre Streifung) in A1 (besonders gut erkennbar bei den größeren Zahnwalen wie dem gemeinen Delphin und dem Großen Tümmler) sowie
- iii) eine im Ansatz sichtbare Zellminiaturisierung in V1 (bei den Zahnwalen zeigt sich dieser Trend vor allem in Schicht III, bei den Landsäugetieren eigentlich in allen sechs Schichten, s.u.).

Die übrigen neokortikalen Areale der Delphine, welche hier nicht weiter behandelt werden sollen und in der Literatur großenteils als Assoziationskortex bezeichnet werden (Nieuwenhuys 1998), sind im Gegensatz zu den primären Projektionsarealen morphologisch gesehen deutlich weniger spezifisch, was ihre Homologisierung mit den von terrestrischen Säugetieren (insbesondere den Primaten) bekannten Arealen außerordentlich erschwert.

Bei den beiden hier untersuchten Paarhufern **Schwein** und **Schaf** lässt der Bau des Neokortex ein mit der Situation bei Zahnwalen teilweise übereinstimmendes und teilweise abweichendes Muster erkennen.

Einerseits sind folgende Charakteristika der beiden Huftier- Spezies in vergleichbarer Form auch bei den Zahnwalen vorhanden:

- 1) eine relativ breit angelegte Schicht I (besonders gut erkennbar beim Schaf),

2) eine in manchen Arealen betont neuronendichte Schicht II (insbesondere im Areal M1 beider Spezies und bisweilen auch im Areal A1 beim Schwein sowie in Areal V1 beim Schaf) sowie

3) eine in manchen Regionen unscharf begrenzte und weitläufig ins Album reichende Schicht VI (bei beiden Ungulaten insbesondere in den Arealen S1 und A1, hier auch vereinzelt magnozellular).

Andererseits weist die Hirnrinde beider Ungulaten in den jeweils primär-afferenten Arealen S1, A1 und V1 das essentielle Merkmal eines Koniokortex (Vorhandensein der Schicht IV samt deutlich erkennbaren Körnerzellen) auf, welches den Waltieren überraschenderweise völlig fehlt (s. Kap. 4.4). Dennoch zeigt die Hirnrinde der Paarhufer, im Vergleich zu jener der Delphine, durchaus auch Züge von pyramidisierten Anteilen (am ehesten erkennbar in A1). Dieser Kortex ist damit also ein *balancierter Typ* von Hirnrinde. Die für Landsäugetiere generaltypischen Spezifika einer agranulären und magnozellular-pyramidalen Rinde in M1, eines „raindrop pattern“ in A1 und einer Erhöhung der Packungsdichte mit begleitender Miniaturisierung der Zellkaliber in V1 (letztere v.a. bei höheren Primaten) sind bei beiden Paarhufern relativ deutlich erkennbar (beim Schwein ausgeprägter als beim Schaf). Diese Befunde decken sich mit den bisher veröffentlichten Arbeiten zur Zytoarchitektonik des Neokortex bei Ungulaten (Brodmann 1906, 1909; Simpson und King 1911; Adrian 1943; Woolsey und Fairman 1946; Goller und Hummel 1974; Hummel 1975, 1987; Andrews et al. 1990; Jarvinen et al. 1998).

Die primären Rindenfelder des **Hundes**, eines Vertreters der Raubtiere (Carnivora), zeigen im Vergleich mit denen der Waltiere und Paarhufer eine größere Diversität: Die vier Areale M1, S1, A1 und V1 enthalten ein höheres Maß an intrinsischer Differenzierung und scheinen dadurch etwas deutlicher voneinander abgesetzt. Anders gesagt treten arealunabhängige, also generalisierte und daher „monotone“ Merkmale wie z.B. ein stets arealgleiches Laminierungsmuster hier eher in den Hintergrund; solche Merkmale sind charakteristisch für Cetaceen (und teilweise auch für Ungulaten, s.o.). Daneben treten aber auch beim Hund einige Charakteristika auf, welche für einzelne Areale möglicherweise so etwas wie eine säugerübergreifende (generaltypische) Bedeutung besitzen: Der agranuläre Rindentyp im Areal M1, das Regentropfenmuster im Areal A1 sowie die Zell-Miniaturisierung samt begleitender Zunahme der neuronalen Packungsdichte im Areal V1. Das Areal S1 scheint im

Vergleich zu den anderen drei Regionen eher unspektakulär: der Kortex ist hier abgesehen von einer relativ spärlich mit großen Pyramidenzellen bestückten Schicht V neben einer erkennbaren Schicht IV noch am ehesten durch eine breite Schicht III geprägt (mit teilweise recht großen Pyramidenzellen in den unteren Abschnitten).

Insgesamt zeigen die vier neokortikalen primären Rindenfelder beim Hund ein vergleichsweise differenziertes arealspezifisches Bild, welches in Ansätzen auch schon von einigen anderen Autoren für die vier primären Rindenregionen dieser Spezies berichtet wurde (Brodmann 1905, 1906; Ellenberger und Baum 1912; Tunturi 1944, 1945, 1950; Bromiley et al. 1956; Popova 1968; Gorska 1974; Nickel et al. 1984; Hummel 1987; Hof et al. 1996a).

Bei den beiden Primaten **Gorilla** und **Mensch** weist die Hirnrinde im Vergleich mit den Befunden an den übrigen hier bearbeiteten Säugetieren neben der allgemein größeren Dicke der Rinde eine maximale Zellzahl, Zelldifferenzierung und Schichtengliederung auf. Kein Areal gleicht hier dem anderen. Darüber hinaus ist hier jede Region durch ihre ganz spezifischen Musterkriterien gekennzeichnet, welche im Prinzip zwar auch bei den anderen hier bearbeiteten Säugetieren auftreten können, bei den beiden Primaten in den Arealen M1, A1 und V1 jedoch zusammenkommen und eine extreme Ausprägung zeigen.

Typisch für das Areal M1 sind i) die insgesamt maximale Dicke der Hirnrinde, ii) das Fehlen einer Schicht IV (Agranularität) sowie iii) die maximal großen Riesenpyramidenzellen in Schicht V. Beim Menschen tragen diese auffälligen Zellen zu Ehren ihres Erstbeschreibers auch den Namen „Betz-Riesenpyramidenzellen“ (Rager et al. 2004), doch sind die Perikarya beim Gorilla aber offenbar genauso groß oder noch größer.

Das Areal S1 ähnelt am ehesten dem Areal A1 (s.u.) und zeigt neben einer geringen Zahl an großen Pyramidenzellen in Schicht V auch vereinzelt besonders große Perikaryen von Pyramidenzellen (ähnlich Areal A1) in den tiefen Anteilen von Schicht III.

Das koniokortikale Areal A1 ist besonders geprägt durch die vertikale Säulengliederung (Kolumnen) in Form des Regentropfenmusters („raindrop pattern“, s. Kap. 3.1.3).

Im Areal V1 sind die Neuronen extrem miniaturisiert (kleine runde Körnerzellen) und maximal dicht gepackt: die Arbeitsteiligkeit der koniokortikalen Schicht IV kulminiert



in ihrer Unterteilung (in mehrere Sublaminae). Bei Primaten (Gorilla, Mensch) hat die (bei den anderen Landsäugetieren ansonsten eher relativ dünne Schicht) bis zu einem Drittel der Kortexdicke zugenommen und enthält dabei eine besonders hohe Zahl von winzigen Körnerzellen.

Bei den beiden Primaten lassen sich also zwei diametrale Trends in der Ausprägung des Kortex beobachten: erstens in Richtung eines *agranulären* und mit Riesenpyramidenzellen bestückten Kortex (primär-projizierendes Areal M1) und zweitens hin zur *koniokortikalen* Organisation der primär-rezeptiven Rindenfelder (Areale S1, A1 und V1) mit einem Maximum an architektonischer Komplexität in Areal V1. Von diesen Regionen zeigen interessanterweise die Areale S1 und vor allem A1 im Nissl-Zellbild wegen ihrer vergleichsweise deutlichen kolumnären Streifung eine eher vertikale Textur, während das Areal V1 wegen seiner maximal komplexen Schichtengliederung neben einer kolumnären Ausrichtung auch eine deutliche horizontale Textur aufweist. Die erhobenen Befunde decken sich gut mit bisher veröffentlichten Arbeiten zur Kortexstruktur bei Primaten im Nissl-Zellbild (Brodmann 1909; Von Economo und Koskinas 1925; Braak 1980; Leonhardt und Lange 1987; Zilles 1987; Rager et al. 2004).

Die hier angestellten Vergleiche verschiedener Kortizes zeigen insgesamt, dass sich die extremen Ausprägungsformen des Neokortex bei **Säugetieren** nicht nur anhand ihrer morphologischen Charakteristika unterscheiden lassen, sondern dass für diese Struktureigenschaften der Kortizes (Motorik, Somatosensibilität, Akustik, Optik) physiologische Korrelate existieren (s.u.). Dabei zeigen sich die größten Unterschiede in der kortikalen Musterbildung der einzelnen Areale M1, S1, A1 und V1 interessanterweise bei Gorilla und Mensch (also innerhalb der Primaten). Beim Hund (einem Raubtier) sind diese beiden Trends der kortikalen Differenzierung (*agranulär- pyramidal* vs. *granulär- koniokortikal*) zwar gut erkennbar, jedoch sehr viel weniger deutlich als bei den beiden Primaten. Ebenso verhält es sich mit den Paarhufern Schwein und Schaf. Bei ihnen sind die einzelnen Kortexareale zwar immer noch gut voneinander abgrenzbar, doch verschwimmen hier (verglichen mit den beiden Primaten) die Unterschiede in der morphologischen Differenzierung der koniokortikalen Areale S1, A1 und V1. Ein Minimum an kortikaler Differenzierung findet sich dagegen bei den Zahnwalen. Hier treten zwischen dem primär-

projizierenden Rindenfeld M1 einerseits und den primär-sensorischen Rindenfeldern S1, A1 und V1 andererseits deutlich geringere Unterschiede zutage. Zwar sind die primären Projektionsareale innerhalb des Neokortex immer noch die morphologisch am stärksten individualisierten Rindenareale und lassen sich mit etwas Übung an speziellen Kriterien zu unterscheiden, doch zeigen bei den Delphinen sämtliche Kortizes arealübergreifend (M1-V1 und höhere Areale; Kern und Oelschläger, unpubliziert) eine nachhaltige Überprägung durch die beiden Phänomene Agranularität und Pyramidisierung. Eindeutige koniokortikale Rindenbereiche sind nirgendwo zu finden, auch nicht in den primär-rezeptiven Rindenfeldern. Die Charakterisierung und Diskriminierung der übrigen neokortikalen Areale bei Delphinen (also der sogenannten Assoziationsareale, welche hier nicht weiter berücksichtigt werden) scheinen noch deutlich schwieriger. Zu diesem Thema existieren nur sehr wenige ältere Originalarbeiten, die in ihrer Summe nicht sonderlich aussagekräftige Schlussfolgerungen hinsichtlich der Rindenarealisierung bei Zahnwalen anbieten (Kojima 1951; Kesarev 1971, 1977).

Die morphologische Diskrepanz zwischen den Rindenformationen (Areale M1-V1) der untersuchten Säugetiere, vor allem aber bei den Extremformen **Cetaceen** (*Zahnwale*) und **Primaten**, wirft Fragen nach grundsätzlichen Unterschieden in der Funktionsweise der jeweiligen Kortizes bei beiden Säugetierordnungen auf. Histozytologisch gesehen sind diese frappierenden Unterschiede bereits im Nissl-Zellbild deutlich zu erkennen. Für eine vertiefte Analyse mit Folgerungen im Hinblick auf funktionelle Implikationen müssen jedoch jenseits der Nissl-Morphologie weiterführende aussagekräftige Techniken herangezogen werden. Dafür wurden in der vorliegenden Arbeit spezielle histologische Verfahren eingesetzt (Kap. 2.3.4 und 2.3.5), welche zunächst die detailliertere Charakterisierung der Kortex-Neuronen auf rein zellmorphologischer Basis erlauben (Golgi-Silberimprägnation, siehe unten), und dann zusätzlich auch neurochemisch-funktionale Eigenschaften der Zelltypen analysieren helfen (Immunhistochemie, siehe unten).

#### **4.2.2 Zelltypen im Neokortex des Schweinswals**

Bei der zellmorphologischen Untersuchung der Hirnrinde eines Schweinswals- als einem Vertreter der Zahnwale - mit Hilfe der Golgi-Silberimprägnation zeigt sich, dass ein Großteil der bisher vornehmlich für andere Mammalier im Detail

beschriebenen Neuronentypen auch im Neokortex dieses Wassersäugers zu finden ist. Pyramidenzellen, bipolare und multipolare Neuronen, Doppelbuschzellen (double bouquet cells), Kandelaberzellen (chandelier cells) und Martinotti-Zellen, all diese Neuronen sind spezifische Bestandteile der Hirnrinde bei Säugetieren allgemein und bilden in ihrer Gesamtheit auch die typische zelluläre Grundausstattung im Neokortex der Wale und Delphine (s. Kap. 3.4; Glezer et al. 1992; Nieuwenhuys 1994; Hof et al. 2000; Glezer 2002; Rager et al. 2004; Hof et al. 2005; Hof und Sherwood 2005). In der Rinde des Schweinswals sind neben ‚typischen‘ Pyramidenzellen interessanterweise auch ‚modifizierte‘ Pyramidenzellen als sog. „extravertierte“ Neuronen in Schicht II (siehe unten) zu finden (s. Kap. 3.4.1), welche in der Vergangenheit Anlass zu Spekulationen gegeben haben (Glezer et al. 1988; s.u.).

Bei der detaillierten Betrachtung einzelner Neuronentypen im Schweinswal-Neokortex fallen folgende, teilweise schon früher beschriebene Aspekte besonders ins Auge (Pilleri et al. 1968; Kraus und Pilleri 1969a, 1969b, 1969c; Pilleri und Kraus 1969; Kraus und Pilleri 1972; Morgane und Jacobs 1972; Garey et al. 1985; Ferrer und Perera 1988; Glezer und Morgane 1990; Morgane et al. 1990; Furutani 2008):

Im Schweinswal-Kortex finden sich (wie offenbar bei Wäلتieren im Allgemeinen) so gut wie alle bei anderen Säugetieren üblichen Neuronentypen. Allerdings dominieren typische Pyramidenzellen das Erscheinungsbild dieses Kortex und die Nicht-Pyramidenzellen treten quantitativ eher in den Hintergrund (das Prinzip der „Pyramidisierung“). Auch wirken die meisten Neuronentypen beim Delphin in ihrer Erscheinung eher mäßig abgeleitet, d.h. sie sind morphologisch innerhalb der Säugetiere nicht sonderlich charakteristisch (Prinzip der Uniformität; Glezer et al. 1988; Glezer und Morgane 1990; Morgane et al. 1990). Zusätzlich treten in der Hirnrinde von Delphinen noch vergleichsweise exotische Neuronenformen auf, die bisher innerhalb der Säugetiere bei als ursprünglich (plesiomorph) geltenden Insektivoren wie dem Igel sowie echootenden Fledermäusen (Mikrochiropteren) beschrieben worden sind. Es handelt sich dabei zum einen um die in Schicht II vorkommenden „extravertierten“, also mit ihren Dendriten schräg nach außen gerichteten Neuronen (extraverted neurons) und zum anderen um große, multipolare Zellen in den Schichten III bis V (Valverde und López-Mascaraque 1981; Valverde 1986; Valverde et al. 1986; Valverde und Facal-Valverde 1986; Ferrer 1987; Fitzpatrick und Henson 1994; Valverde et al. 2002). Im Hinblick auf funktionelle Aspekte bei der neuronalen Verschaltung des Delphin-Neokortex spielen diese als

„antiquiert“ geltenden Neuronentypen neben den dominierenden typischen Pyramidenzellen höchstwahrscheinlich eine entscheidende Rolle (s. Kap. 4.4).

#### 4.2.3 Die immunhistochemische Analyse des Kortex

Aus der Bearbeitung der vier primären Rindenfelder M1, S1, A1 und V1 bei verschiedenen Spezies (Schweinswal, Großer Tümmler, Schwein, Schaf, Hund, Gorilla und Mensch) lassen sich für die jeweils angewendeten neuronalen Marker gegen Calbindin (CB), Calretinin (CR), Parvalbumin (PV) und Neurofilament (NF) interessante vorläufige Schlüsse ziehen. Für die funktionellen Abläufe innerhalb des Kortex spielen diese Marker eine wesentliche Rolle: die genannten calciumbindenden Proteine (CB, CR und PV) werden in ihrer Gesamtheit von ca. 95% aller GABAergen (also inhibitorischen) Interneuronen exprimiert (Glezer et al. 1998; Hof und Sherwood 2005, 2007; Sherwood et al. 2009). Somit sind Antikörper gegen diese Proteine exzellente Marker für inhibitorische Interneuronen im Allgemeinen. Dagegen eignet sich NF vor allem für die Detektion von exzitatorischen Projektionsneuronen: Neurofilament tritt dabei als Strukturprotein in großen Pyramidenzellen auf, welche vornehmlich in den tieferen Schichten (meist L III bis V) des Neokortex lokalisiert sind (Hof et al. 1992; Hof und Sherwood 2005, 2007; Sherwood et al. 2009; Ding und Van Hoesen 2010; Goldshmit et al. 2010; Van De Werd et al. 2010).

##### Calciumbindende Proteine (CB, CR und PV):

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der „Calciumbinder“ ergab sich, dass ihr Auftreten im Kortex innerhalb der einzelnen Säuger teilweise stark variiert. In den beiden untersuchten **Zahnwalen** (Schweinswal und Großer Tümmler) zum Beispiel sind CB-positive Neuronen in keinem der untersuchten Areale nachweisbar. Ein Ergebnis, welches bereits von anderen Autoren für die Areale A1 (Weißwal) und V1 (Großer Tümmler) in ähnlicher Weise beschrieben wurde (Hof et al. 1999, 2000; Hof und Sherwood 2007). Im Kortex der hier untersuchten Delphine überwiegen stattdessen insgesamt CR-positive Zellen, zum einen vermehrt als kleinere bipolare Neuronen in den oberen Schichten I und II, zum anderen als etwas größere vereinzelte multipolare Zellen im Gebiet um ein ansonsten relativ CR-Interneuron-freies Band im Schichtkomplex III und V. In deutlich schwächerer Ausprägung finden sich singuläre PV-markierte Zellen in den Schichten I und II sowie in wenigen Fällen

auch im Zentrum des Kompartiments L III/V sowie am Übergang von Schicht V zu Schicht VI. Zur Bedeutung dieser topographischen Verteilung der Calciumbinder s.u.

Bei den beiden untersuchten Paarhufern **Schwein** und **Schaf** sind CB-haltige Interneuronen (zumeist Bipolare) im Falles des Schweins relativ zahlreich und in fast allen Schichten vorhanden, beim Schaf dagegen eher spärlich und vornehmlich in den mittleren Schichten III und IV lokalisiert. Die CR-markierten Zellen (ebenfalls vor allem Bipolare) sind recht ähnlich angeordnet wie bei den Delphinen, wenn auch zahlenmäßig unterschiedlich (beim Schwein sind tendenziell mehr, beim Schaf höchstens gleich viele oder sogar weniger markierte als unmarkierte Zellen vorhanden). Sie sind hauptsächlich in den oberen Schichten L I / II sowie in einer Zone um die koniokortikale Schicht IV am Übergang zu Schicht V eingestreut. Ganz vereinzelt finden sich CR-positive Interneuronen in einem ansonsten größtenteils CR-freien Kortexband in der Mitte der Schicht III (teils auch als große multipolare Neuronen). PV-positive Zellen zeigen sich bei beiden Paarhufern in allen Schichten mit einer leichten Betonung von L III und IV, speziell in den primär-rezeptiven Arealen S1, A1 und V1. Sie entsprechen dort meist eher dem Typus der multipolaren, rundlichen Zelle mit mittelgroßem Perikaryon. Weiteres zur Bedeutung der Immunreaktivität s.u.

In der Hirnrinde des carnivoren **Hundes** ergibt sich im Vergleich zur Situation bei den untersuchten Delphinen und Paarhufern ein relativ differenzierteres Bild, d.h. das Gefüge der Neuronenpopulationen erscheint komplexer. Insgesamt gesehen sind die immunhistochemischen Befunde beim Hund denen des Schweins ähnlicher als denen des Schafes. Kleine CB-gelabelte Zellen sind in großer Zahl und in allen kortikalen Schichten zu finden. Dagegen sind CR-markierte Zellen (meist bipolare Neuronen) vermehrt in den oberen Schichten L I und II lokalisiert. Ganz vereinzelt lassen sie sich auch in Gestalt großer multipolarer Zellen in einem ansonsten eher CR-armen Band in den mittleren Kortexschichten L III, IV und V nachweisen. PV-positive Neuronen finden sich in fast allen kortikalen Schichten meist als multipolare Zellen, vermehrt jedoch in den mittleren Schichten L III und IV. Eine frühere Studie von Hof und Kollegen lieferte beim Hund für die Calciumbinder CB, CR und PV in den Arealen M1, S1 und V1 ein vergleichbares Resultat (Hof et al. 1996a). Zur Bedeutung der immunocytochemischen Ergebnisse s.u.



Bei den analysierten Primaten **Gorilla** und **Mensch** bietet sich mit Blick auf die calciumbindenden Proteine ein noch stärker differenziertes Bild. CB-markierte Zellen sind in großer Zahl in allen Schichten der Hirnrinde zu finden, bisweilen leicht vermehrt in den höheren Regionen. Sie sind meist recht klein und rundlich (in den koniokortikalen Regionen erreichen die betreffenden Somata in den mittleren Schichten III und IV minimale Durchmesser), können vereinzelt aber auch magnozellular und multipolar auftreten, vor allem in Areal M1. Die CR-positiven, zumeist bipolaren Neuronen gehören dagegen eindeutig zu den Schichten L I und II, sowie zu den oberen Anteilen von L III. Nur vereinzelt treten CR-gelabelte Neuronen als größere, multipolare Somata in Erscheinung (insbesondere im Projektionsareal M1). PV-markierte Zellen dagegen wurden vermehrt in den mittleren Zonen von L III und IV nachgewiesen, mit einem Trend zur Miniaturisierung der Somata in den granulären, koniokortikalen Anteilen der primär-rezeptiven Felder (insbesondere V1, weniger A1 und S1). Im primär-projizierenden Areal M1 werden ganz vereinzelt auch relativ großkalibrige multipolare PV-gelabelte Zellen angetroffen. Ein Ergebnis, welches in vergleichbarer Form auch schon in früheren Arbeiten gezeigt wurde (Glezer et al. 1993, 1998; Morrison et al. 1998; Hof et al. 2000; Lewis und Van Essen 2000; Hof und Sherwood 2005, 2007; Jones 2009). Zur funktionellen Bedeutung der Immunreaktivität s.u.

Zusammenfassend lässt sich also insgesamt Folgendes festhalten:

Calbindin (CB), Calretinin (CR) und Parvalbumin (PV):

Bei den **Delphinen** ist der Kortex vornehmlich von Calretinin und sehr vereinzelt auch von Parvalbumin geprägt. Die CR-positiven Interneuronen kommen dabei hauptsächlich als kleine bipolare Zellen in den oberen Schichten I und II sowie teils auch als größere Multipolare im ansonsten eher Calciumbinder-freien Schichtkomplex III-V vor. In diesem Schichtkomplex finden sich auch wenige multipolare PV-Neuronen. Calbindin ist in keinem der untersuchten Areale der beiden Exemplare nachweisbar. Dieses Markierungsmuster ist interessanterweise bei allen vier primären Arealen M1- V1 gleichermaßen angelegt: *es besteht bei den Delphinen also neben der im Nissl-Bild zytoarchitektonisch erkennbaren kortikalen Uniformität auch hinsichtlich der Immunhistochemie eine arealübergreifende strukturelle Monotonie.*

Dagegen zeigt sich bei den **Landsäugetern** hinsichtlich der immunhistochemischen Musterbildung ein stärkeres Labeling. Einerseits sind alle drei Calciumbinder CB, CR und PV nachweisbar und mehr oder minder über alle Schichten verteilt. Andererseits unterscheiden sich hier die vier Areale M1, S1, A1 und V1 untereinander relativ deutlich (verglichen mit der Situation bei den Delphinen) - am stärksten bei den beiden Primaten, gefolgt vom Hund und den beiden Paarhufern. An den CR-immunreaktiven Zellen mit ihrer tendenziell stärkeren Präsenz in höheren Kortexschichten (vor allem L I, II und obere Anteile von L III) sowie den PV-positiven Zellen mit einer Häufung in den mittleren Schichten L III und IV (insbesondere in den koniokortikalen, primär-rezeptiven Arealen) lässt sich in den Arealen M1, S1, A1 und V1 der Landsäuger ein allgemeiner Trend hinsichtlich des Calciumbinder-Topographie ausmachen: *Calretinin (und etwas schwächer auch Calbindin) liegen vermehrt in den oberen Schichten II und III, wohingegen Parvalbumin vor allem in den mittleren Schichten III und insbesondere IV zu finden ist.*

Interessanterweise zeigen bei der Anwendung von anti-Calretinin vor allem die Paarhufer (und in einzelnen Details auch der Hund) in allen vier primären Arealen ein Markierungsmuster, welches dem der Delphine teilweise recht ähnlich ist. Andererseits weichen die bearbeiteten Landsäuger im koniokortikalen Grundcharakter (vorhandene L IV) der primär-rezeptiven Areale S1, A1 und V1 stark von den Delphinen ab.

*Insgesamt lässt sich für die Calciumbinder (insbesondere CR und PV) bei den Landsäugetern das primär-projizierende, agranuläre Areal M1 (Fehlen der Schicht IV, eher allgemeine Pyramidisierung) am besten mit dem Areal M1 der Delphine in Einklang bringen; für die koniokortikalen Areale S1, A1 und V1 trifft dies dagegen nur auf bestimmte Kriterien zu. So sind in diesen Arealen vereinzelte große, multipolare Zellen in den mittleren Kortexschichten (Übergang zwischen L III und V) besonders auffällig.*

#### Neurofilament (NF):

Auch das kortikale Screening auf das neuronale Strukturprotein Neurofilament (NF) brachte im Vergleich der einzelnen Säugetierordnungen interessante Ergebnisse. Das Verteilungsmuster der hierdurch markierten exzitatorischen Projektionsneurone variiert zwar zwischen den verschiedenen Säugetiergruppen, jedoch nicht in dem

Maße wie im Falle der calciumbindenden Proteine (also CB, CR und PV) als Marker der inhibitorischen Interneuronen.

Bei den beiden **Delphinen** kam es nur beim Großen Tümmler, nicht jedoch beim Schweinswal, zu einem verwertbaren Labeling gegen NF. Die hierbei markierten Neuronen sind in allen vier Arealen (M1, S1, A1 und V1) durchweg in L V zu finden, also jener Schicht, die auch im Nissl-Zellbild die größten Pyramidenzellen besitzt. Dieses konstante Verteilungsmuster spricht zumindest beim Delphin hinsichtlich der Expression von NF für eine gewisse Uniformität, auch wenn im Vergleich der einzelnen Areale untereinander insbesondere die Areale M1 (NF-markierte Neuronen relativ groß und weniger zahlreich) und A1 (NF-gelabelte Neuronen mittelgroß und relativ zahlreich) diesbezüglich besonders in Erscheinung treten. Ein vergleichbares Ergebnis mit einem exklusiven Vorkommen von NF-positiven Pyramidenzellen in Schicht V wurde bisher lediglich in einer Originalarbeit jeweils für das Areal A1 eines Weißwals und eines Großen Tümmlers beschrieben (Hof et al. 1992).

Ein dem Labeling beim Großen Tümmler vergleichbares Markierungsmuster findet sich bei den Paarhufern. Jedoch ist die NF-Expression beim **Schwein** ausgeprägter als beim **Schaf**, welches in dieser Hinsicht wegen der mäßigen Markierung dem Delphin ähnlicher ist. Beim Schwein sind die NF-markierten Pyramidenzellen in allen vier Arealen jeweils durchweg in Schicht V zu erkennen, mit besonders betonten Zellmarkierungen im Areal M1 und relativ dezenter Markierung in V1. Beim Schaf sind dagegen nur vereinzelt NF-gelabelte Neuronen zu erkennen, und zwar ebenso durchgängig in Schicht V, jedoch weitaus schwächer ausgeprägt als beim Schwein. Beim Schaf zeigen sich NF-gelabelte Neuronen am deutlichsten im Areal M1; in den Arealen S1 und A1 sind nur vereinzelt, im Areal V1 überhaupt keine NF-markierten Neuronen nachweisbar.

Anders stellt sich die Situation bei einem Vergleich der Verhältnisse beim **Hund** mit denen beim Delphin, Schwein und Schaf dar: zwar finden sich NF-gelabelte Neuronen auch beim Caniden innerhalb der vier untersuchten Kortexareale vornehmlich in Schicht V (besonders deutlich in Areal M1), doch sind darüberhinaus auch in den Arealen A1 und V1 in Schicht III einige Neuronen NF-positiv. Das typische Muster der NF-immunreaktiven Projektionsneuronen (hauptsächlich in Schicht V) wird bei diesem Tier in den Arealen A1 und V1 also quasi um NF-

markierte Zellen in Schicht III erweitert. Für die Areale M1, S1 und V1 des Hundes wurde in einer früheren Veröffentlichung ein vergleichbares NF-Verteilungsmuster beschrieben (Hof et al. 1996a).

Noch spezifischer und auch komplexer (aber in seinen Grundzügen am ehesten mit der Situation beim Hund vergleichbar) zeigt sich das NF-Expressionsmuster bei **Gorilla** und **Mensch**. Bei diesen beiden Primaten finden sich NF-gelabelte Neuronen entweder vornehmlich in Schicht V (besonders deutlich im Areal M1), oder die markierten Zellen sind überwiegend entweder in den mittleren/tieferen Anteilen der Schicht III (Areal S1 und A1) oder in Schicht IV (in Areal V1 beim Gorilla) lokalisiert. Frühere Arbeiten liefern vergleichbare NF-Markierungsmuster in den vier primären Rindenarealen bei Primaten (Hof et al. 1992; Hof and Morrison 1995; Hof et al. 2000; Preuss 2001; Bourne and Rosa 2006; Ding et al. 2009; Sherwood et al. 2009).

Zusammenfassend lässt sich bei der Immun-Markierung auf Neurofilament also Folgendes festhalten: die untersuchten Spezies bzw. Gruppen von Spezies scheinen zwei Trends anzugehören:

- 1) In der einen Gruppe zeigt die Verteilung der NF-Expression ausschließlich auf einige große Pyramidenzellen von Schicht V ein arealübergreifendes (uniformes) Muster. In diese Gruppe fällt wegen seiner gleichförmigen Immunreaktivität vor allem der Große Tümmler; aber auch die Paarhufer Schwein und Schaf zeigen dieses Prinzip.
- 2) In der anderen Gruppe treten in Schicht L V bzw. auch in den Schichten L III oder L IV neben einigen sehr großen NF-gelabelten Pyramidenzellen (Schicht V) auch einige mittelgroße NF-positive Pyramidenzellen auf (Schichten III und IV). Zu dieser Gruppe gehören wegen der Komplexität ihres NF-Verteilungsmusters vor allem Gorilla und Mensch, aber auch der Hund zeigt Anzeichen für diesen Trend.

Im immunhistochemischen Abschnitt dieser Schrift wurde über die Markierung der Calciumbinder CB, CR und PV sowie den Nachweis des Strukturproteins NF bei den einzelnen Säugetier-Spezies eine erstaunliche Variabilität der Expressionsmuster erkennbar. Dabei sind bei der Beurteilung von Säuger-Kortizes sowohl Übereinstimmungen als auch Unterschiede in den „Trends“ (s.o.) von Interesse, weil diese in einer funktionellen bzw. evolutionsbiologischen Argumentation von

Bedeutung sein können. Eine daraufhin ausgerichtete Analyse kann die Arbeitsweise des Kortex sowohl allgemein bei Säugetieren als auch speziell bei Zahnwalen klären helfen (s. Kap. 4.4). Die Delphine stellen durch den aberranten, arealunabhängig tendenziell uniformen Bau ihrer Hirnrinde (sowohl in der Nissl-, Golgi- und Immunhistologie) ein Extrembeispiel für die kortikale Organisation der verschiedenen primären Projektionsareale dar. Im folgenden Kapitel beschäftigt sich diese Arbeit deshalb mit der Frage, ob in dem zunächst monoton anmutenden Delphinkortex die vier primären Rindenareale (M1, S1, A1 und V1) möglicherweise anhand der Zelldichte (also Packungsdichte) in bestimmten Rindenschichten grundsätzlich unterschieden werden können.

#### **4.2.4 Stereologische Analyse des Zahnwal- Kortex: Erkenntnisse zur Zelldichte beim Schweinswal und beim Großen Tümmler**

Das bislang unverstandene Phänomen der Uniformität des Zahnwal-Kortex (Kruger 1966; Kesarev 1970, 1971; Morgane und Jacobs 1972; Preobrashenskaja et al. 1973; Kesarev et al. 1977; Bullock und Gurevich 1979; Morgane et al. 1986a, 1986b; Glezer et al. 1988; Preuss 1995; Glezer 2002; Oelschläger und Oelschläger 2002) wurde in der vorliegenden Schrift unter anderem mit Hilfe einer stereologischen Analyse (vgl. Kap. 3.6) genauer untersucht. Schon das Nissl-Zellbild zeigt, dass sich die vier primären Neokortex-Areale M1, S1, A1 und V1 bei vergleichender Betrachtung insgesamt nur relativ geringfügig voneinander unterscheiden, ganz im Gegensatz zur Situation bei Landsäugetieren, vor allem aber den Primaten. Bei Zahnwalen lassen sich hierbei an Unterscheidungskriterien allenfalls gewisse Tendenzen ausmachen. Als Beispiele hierfür können die Größe der Somata der Pyramidenzellen in Schicht L V von Areal M1 sowie das angedeutete "raindrop pattern" (Vertikalstreifung durch kolumnäre Anordnung der Neuronen) in Areal A1 dienen; beide Tendenzen sind bei unseren Zahnwalen allerdings moderat ausgeprägt. Auch die im Ansatz erkennbare Miniaturisierung von Somata samt einer gewissen Zunahme der Neuronendichte in Areal V1 kann als ein solches Merkmal gelten. Insgesamt gesehen sind diese Unterschiede jedoch vergleichsweise wenig offensichtlich und treten erst bei einer direkten Gegenüberstellung der vier primären Projektionsareale deutlicher zutage. Infolgedessen dient der letzte Abschnitt der vorliegenden Arbeit dem Versuch, diese qualitative Unterscheidbarkeit der Delphinkortizes auch mit quantitativen Methoden zu erfassen. Die Analyse und



Interpretation der hier mit dem neuen Begriff ‚core units‘ (Definition s.u.) bezeichneten Einheiten (s.u.) wird an zwei Zahnwalen exerziert: dem Schweinswal, welcher als Küstendelphin innerhalb der kleinen Zahnwale vergleichsweise moderat enzephalisiert ist, und dem Großen Tümmler, welcher ein deutlich höheres Körpergewicht aufweist und als hochenzephalisierter Delphin weltweit in allen Meeren inklusive der Hochsee verbreitet ist (s. Tab. 2.2-4; Rice 1998).

#### *Definition der ‚core unit‘*

In der vorliegenden Arbeit bezeichnet der neu eingeführte Begriff ‚core unit‘ in Anlehnung an das modulare Kortexprinzip nach Szentágothai (1975) die zentrale Funktionseinheit des Neokortex, bestehend aus folgenden Anteilen (s. Kap. 1.5 und Kap. 4.3):

- 1) dem **afferenten Eingang** (hauptsächlich thalamische Projektionen)
- 2) der **intrinsischen exzitatorischen und inhibitorischen Verschaltung** im Kortex, sowie
- 3) dem **efferenten Ausgang** (Axone von Pyramidenzellen projizieren horizontal in andere kortikale oder vertikal in subkortikale Zielgebiete).

Eine damit verbundene, weiterführende Idee besteht nun darin, dass in einer solchen hier stark vereinfachten schicksalhaften Neuronenkette (loop) Änderungen des Nervensystems in der Peripherie naturgemäß Modifikationen in den nach- bzw. übergeordneten Zentren bedeuten. Hier müssen letzten Endes auch die physikalischen Parameter angreifen: sie machen dem Nervensystem ein Reizangebot, welches vom Individuum innerhalb der gesetzten Rahmenbedingungen durch sinnvolle Reaktionen möglichst optimal beantwortet werden muss. Dadurch können in Raum und Zeit Adaptationstrends in Gang gesetzt werden, welche sich über Mutation und Selektion im Genom abbilden und damit die Richtung der Evolution einer Spezies abwandeln. Als ein Beispiel kann vielleicht der physikalische Parameter Schall bzw. Ultraschall dienen, welcher von Delphinen quasi mit neu erfundenen Stimmorganen erzeugt wird (s. Oelschläger 2008; Huggenberger et al. 2009; Oelschläger und Oelschläger 2009), aufgrund seines effizienten und schnellen Transports im Wasser bei der Echoorientierung hohe Anforderungen an die intrinsische Verarbeitungsgeschwindigkeit des Gehirns stellt und wahrscheinlich deshalb die Herausbildung eines scheinbar einfacheren Kortex mit einer Tendenz zu weniger, aber dafür größeren ("schnelleren") Pyramidenneuronen favorisieren dürfte. Hierbei handelt es sich damit vermutlich auch um eine der Ursachen für die bislang rätselhafte Uniformität des Wal-Kortex (weiteres hierzu s.u.) bzw. für das weitgehende Fehlen von Körnerzellen. Ein solcher Kortex könnte seine Stärke in der vergleichsweise unkomplizierten, aber schnellen Verarbeitung großer Mengen von akustischem Input haben.

Schon in der Nissl-Übersicht scheinen beim Vergleich der vier Areale der beiden Zahnwale miteinander die Schichten L III und L V eine herausragende Rolle einzunehmen. An diesen beiden Schichten sind die zytoarchitektonischen Spezifika von Rindenarealen im Nissl-Bild am deutlichsten zu erkennen. Dagegen zeigen die vier Areale in den übrigen kortikalen Schichten weit weniger Unterschiede. So scheint Schicht I sehr zellarm, Schicht II dagegen generell sehr zellreich zu sein, und Schicht VI wirkt zu variabel für eine stereologische Analyse mehrerer Kortexareale zweier Spezies. Hinzu kommt bei Überlegungen zu einem stereologischen Vergleich der beiden Zielregionen L III und L V die Tatsache, dass bei Zahnwalen beide Schichten in der kortikalen Konnektivität (und damit im funktionellen Grundkonzept der kortikalen Arbeitsweise) eine zentrale Rolle zu spielen scheinen und sich daher in idealer Weise zur Untersuchung einer möglichen ‚core unit‘ im Zahnwalkortex anbieten (s. Kap. 4.3 und Kasten S. 159).

Interessanterweise zeigen die beiden Schichten in den Kortizes der beiden Zahnwale jeweils dieselbe Tendenz. Während sich die Neuronendichten in Schicht L V sowohl beim Schweinswal als auch beim Großen Tümmler innerhalb der Areale kaum voneinander unterscheiden (eine Ausnahme scheint hier lediglich Schicht V in Areal V1 beim Tümmler zu sein), treten in Schicht III für die einzelnen Areale deutliche Dichteunterschiede zutage: in einem bei beiden Tieren erkennbaren Trend nehmen die Zelldichten in der topographischen Reihenfolge der Areale  $M1 \Rightarrow S1 \Rightarrow A1 \Rightarrow V1$  relativ konstant zu (vgl. Tab. 3.6-3, 3.6-6 und 3.6-7 sowie Abb. 3.6-1 und 3.6-2).

Bis heute haben sich lediglich Garey und Leuba (1986) mit der schichtenspezifischen Neuronendichte beim Großen Tümmler beschäftigt, und zwar im Areal V1. Ihre Ergebnisse passen in der Größenordnung (Durchschnittsdichte von Schicht III: 33,6 Mio. Somata /  $\text{cm}^3$ ) sehr gut zu den Befunden der vorliegenden Untersuchung (Neuronendichte von Schicht III in Areal V1 beim Tümmler: 40,8 Mio. Somata /  $\text{cm}^3$ ). Die Vorgehensweise und die Daten von Garey und Leuba können somit, trotz gewissen Unterschieden in der Methodik, als ein Korrektiv bzw. hier als Kriterium für die Validität der stereologischen Methodik in der vorliegenden Analyse dienen, zumindest in erster Näherung. Für die Areale M1, S1 und A1 wurden bisher noch keine vergleichbaren stereologischen Analysen durchgeführt. Auf andere quantitative Arbeiten zum Thema Zahnwalkortex sei an dieser Stelle nur verwiesen (Poth et al.

2005; Eriksen und Pakkenberg 2007; Butti et al. 2009; Walloe et al. 2010); die Befunde dieser Arbeiten werden im Abschnitt 4.4 noch ausführlich diskutiert.

### **4.3 Funktionelle Implikationen**

#### **4.3.1 Der Bauplan des Säugetierkortex**

Grundsätzlich scheinen der Bau und die Funktion des Neokortex bei den Säugetieren einem einheitlichen Grundmuster zu folgen. Die von Karl Brodmann (1909) veröffentlichte „Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde“ zeigt bei einer Vielzahl von Säugetier-Spezies bzw. -gruppen gewissermaßen diverse Subtypen des Neokortex. Bei ausgewählten Hirnrindenproben von Mensch, Affe (Makake), Halbaffe (Lemur), Flughund, Wickelbär, Kaninchen, Ziesel, Igel und Känguruh fand Brodmann einen stets ähnlichen Bauplan des Kortex, den er als "...sechsschichtigen tektogenetischen Grundtypus“ beschreibt (Brodmann 1909). Diesem Grundtypus entsprechend soll der Neokortex primär bei allen Säugetierordnungen generell aus sechs Schichten aufgebaut sein. Nach Creutzfeldt (1977), Szentágothai (1978) sowie Rockel et al. (1980) soll diesem Grundtypus in der Schichtengliederung des Kortex ein intrinsisches zellmorphologisches Äquivalent entsprechen: bei systematisch unterschiedlichen Säugetieren haben neokortikale Neuronentypen demnach vergleichbare Aufgaben (Szentágothai 1975; Creutzfeldt 1977; Szentágothai 1979; Rockel et al. 1980). Abweichungen in der Zytoarchitektonik und in der Verschaltung innerhalb von kortikalen Modulen (Kolumnen) sollen lediglich auf Unterschieden in ihrer Verschaltung hinsichtlich afferenter Terminationen und efferenter Zielstrukturen beruhen.

Interessanterweise scheint der Delphin-Kortex diesem postulierten Grundbauplan nicht zu folgen. Er besteht aus fünf Schichten, eine innere Körnerschicht (Layer IV) lässt sich in keinem der in dieser Arbeit untersuchten primären Hirnrindenareale von Zahnwalen finden. Auch frühere Analysen des Zahnwalkortex untermauern den hiesigen Befund (Morgane und Jacobs 1972; Morgane et al. 1985, 1986a, 1986b, 1986c; Ferrer und Perera 1988; Glezer et al. 1988; Glezer und Morgane 1990; Morgane und Glezer 1990; Morgane et al. 1990; Glezer et al. 1991, 1992; Hof et al. 1992; Preuss 1995; Hof et al. 2000; Glezer 2002; Fung et al. 2005; Hof et al. 2005; Hof und Sherwood 2005, 2007; Marino 2007; Oelschläger 2008; Oelschläger und Oelschläger 2009). Eine Ausnahme hiervon zeigt die histologische Untersuchung von Kortexproben aus dem visuellen Areal mehrerer Tümmler (*Tursiops truncatus*) von

Garey et al. (1985), unter ihnen auch ein 18-Tage altes Jungtier (Garey et al. 1985). Diese Autoren konnten mit Hilfe von Nissl- und Golgi-Material zeigen, dass sich bei diesem Jungdelphin mit noch nicht abgeschlossener Kortex- Differenzierung zwischen den Schichten III und V eine deutlich erkennbare granuläre Zellbande befindet. Die Autoren bezeichnen diese Schicht als „rudimentäre Schicht IV“. Auch in der visuellen Hirnrinde eines 3 Jahre alten juvenilen Delphins sind noch Reste einer solchen Körnerzellschicht zu erkennen. In erwachsenen Tieren dagegen ist Schicht IV im visuellen Areal nicht mehr auffindbar.

Nun stellt sich die Frage, inwieweit die oben beschriebene bemerkenswerte zytoarchitektonische bzw. morphologische Abweichung des Zahnwalkortex von der Hirnrinde der Landsäugetiere auch funktionelle Unterschiede (die kortikale Verschaltung betreffend) widerspiegeln könnten. Zur Klärung dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit die kortikale Verschaltung der untersuchten wasserlebenden Delphine exemplarisch derjenigen von hochentwickelten Primaten (Gorilla und Mensch) gegenübergestellt. Die übrigen in dieser Arbeit untersuchten Säugetiere (Schwein, Schaf und Hund) wurden erst nach der Feinanalyse der beiden Extremformen Delphine und Primaten in einen erweiterten Vergleich einbezogen. Dabei sollte von den primären Hirnrindenarealen für jede dieser beiden "Modellgruppen" von Säugetieren die jeweils besonders charakteristische bzw. dominant erscheinende Region genauer diskutiert werden. Für die terrestrischen Primaten gilt dies für das primär-visuelle Areal (V1), für die mit einem hochentwickelten Sonar-System ausgestatteten aquatischen Delphine dagegen für das primär-auditorische Areal (A1; s. Tabelle 4.3-1). Genauere Hintergründe zur Cerebralisation und Phylogenese der beiden Säugetiergruppen liefern die Kap. 1.2 und 1.3.

**Tab. 4.3-1** Repräsentative Rindenareale bei Primaten und Cetaceen

<u>Säugerordnung</u>	<u>Repräsentatives Rindenareal</u>
Primaten (z.B. Mensch)	Primär-visuelle Rinde (V1)
Cetaceen (z.B. Delphin)	Primär-auditorische Rinde (A1)

Die Feinanalyse der Konnektivität einer kortikalen Funktionseinheit (core unit, s.o.) erfolgt dabei in drei Schritten, entsprechend den daran beteiligten Systemen:

- 1) *Input* (afferentes System)
- 2) *Intrinsische Verschaltung*
- 3) *Output* (efferentes System)

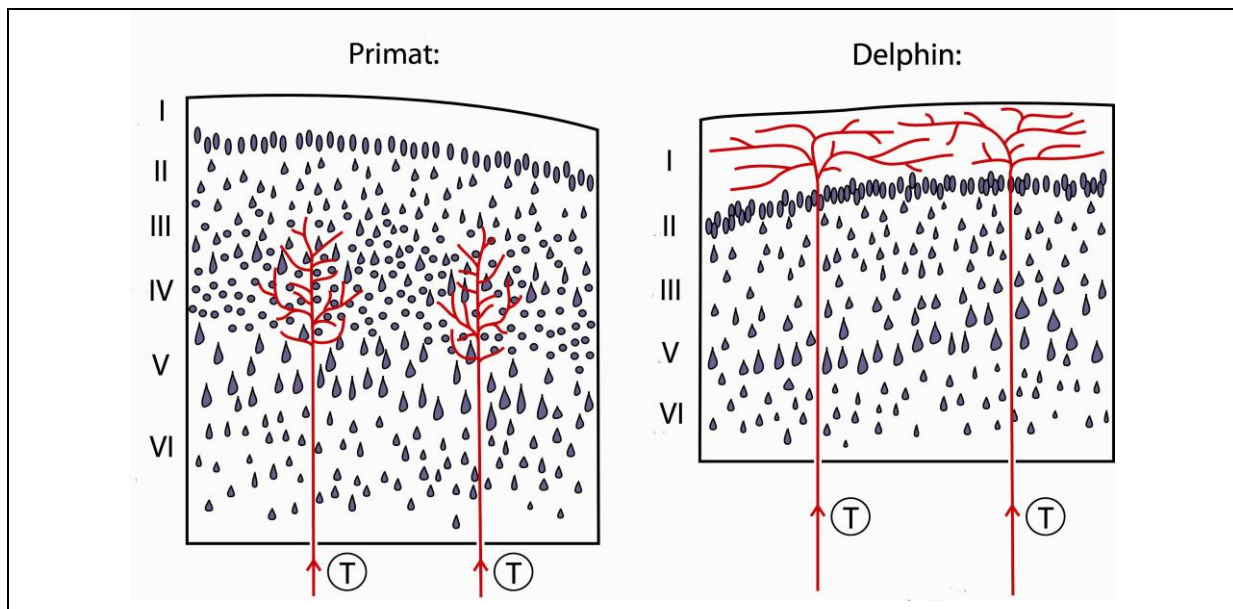
#### **4.3.1.1 Der thalamische Input**

Bei *Primaten* enden aus dem Thalamus eingehende visuelle Signale in allen sechs Schichten (I-VI) des visuellen Neokortex, vor allem jedoch in Schicht IV (Hubel und Wiesel 1962, 1968; Szentágothai 1970; Hubel und Wiesel 1972; Szentágothai 1975; Hubel und Wiesel 1977; Szentágothai 1978; White 1978; Szentágothai 1979; Hersch und White 1981; White und Hersch 1981; Hersch und White 1982; Livingstone und Hubel 1982; White 1982, 1989; Nieuwenhuys 1994; Valverde et al. 2002; Nassi und Callaway 2007, 2009; Lyon et al. 2010; Kätzel et al. 2011). Diese Schicht enthält besonders viele Körnerzellen und ist in die Unterschichten IVa, IVb und IVc gegliedert, wobei IVc nochmals in die Regionen IVc $\alpha$  und IVc $\beta$  unterteilt werden kann (Brodmann 1909; Rose 1935; Bailey und von Bonin 1951; Hubel und Wiesel 1968; Garey 1971; Lund 1973; Lund und Boothe 1975; Braak 1976; Lund et al. 1979; Braak 1980; Rockel et al. 1980; Lund 1984; Nieuwenhuys 1994; Hof et al. 1999; Nassi und Callaway 2009; vgl. Kap. 3.1.4; Abb. 4.4-1). Thalamische Afferenzen wirken dabei vor allem in Schicht IVc aktivierend, sowohl auf die dort vorherrschende Population sogenannter bedornter Sternzellen (spiny stellate cells) als auch in einem etwas geringeren Umfang auf sogenannte unbedornte Sternzellen (aspiny stellate cells; Abb. 4.4-1; White 1978; Livingstone und Hubel 1982; Peters und Jones 1984; White 1989; DeFelipe und Farinas 1992; Huntley et al. 1994; Nieuwenhuys 1994; Valverde et al. 2002). Diese Zellen sind sehr klein, multipolar und werden der Morphologie ihres Dendritenbaums wegen entweder als bedornt oder unbedornt bezeichnet (Nieuwenhuys 1994, 1998, Rager et al. 2004). Dabei gelten die bedornten Zellen als exzitatorisch, die unbedornten als inhibitorisch (Lund 1973, 1984; Nieuwenhuys 1994, 1998; Smith und Populin 2001; Valverde et al. 2002; Linden 2007). Ihre Funktion besteht allgemein in der Übermittlung von thalamischer Information in die supragranulären Schichten II und III, wo eine Feinanalyse der eingehenden Erregung und eine Weiterverschaltung auf nachfolgende Assoziationsareale erfolgt (Lund et al. 1979; Barlow 1981; Gilbert und Wiesel 1983; Lund 1984; Galuske 1994; Dudek and Friedlander 1996; Smith and Populin 2001; Rager et al. 2004; Kätzel et al. 2011; s. nächstes Kap. 4.3.1.2).



Bei *Zahnwalen* dagegen fehlt Schicht IV weitestgehend: keines der in dieser Schrift untersuchten Neokortex-Areale konnte als ein echter Koniokortex (definiert durch die Existenz einer Körnerzellschicht IV) identifiziert werden. In früheren Untersuchungen wurde vermutet, dass bei Zahnwalen insbesondere Schicht I (Molecularis) als Ziel für thalamischen Input fungiert, und zwar einerseits, weil ca. 70% aller kortikalen Synapsen beim Delphin in dieser Schicht liegen sollen (Glezer und Morgane 1990). Andererseits wurde geltend gemacht, dass die Kombination aus einer breit angelegten Schicht I und den extravertierten Neuronen in Schicht II stark an vergleichsweise ursprüngliche Säugetiere wie Insektenfresser (Insektivoren: z.B. Igel) und einige insektenfressende Fledermäuse erinnert, bei denen der Thalamus vornehmlich in Schicht I projiziert (Sanides und Sanides 1972; Valverde und López-Mascaraque 1981; Valverde 1983; Valverde et al. 1986; Valverde und Facal-Valverde 1986; Ferrer 1987; Ferrer und Perera 1988; Glezer et al. 1988; Glezer und Morgane 1990; Morgane et al. 1990; Glezer et al. 1992; Hof et al. 1999; Valverde et al. 2002; Marino 2007).

Die folgende Abbildung 4.3-1 zeigt schematisch die wesentlichen strukturellen Unterschiede zwischen Primaten und Delphinen hinsichtlich des Eingangs der thalamischen Afferenzen in den Neokortex:



**Abb. 4.3-1: Unterschiede in der Projektion thalamischer Afferenzen in den Neokortex bei zwei exemplarischen Gruppen von Säugetieren.**

Bei Primaten (links) und Delphinen (rechts) projizieren die thalamischen Haupt-Afferenzen (T) in unterschiedliche Kortexschichten: die vom Mark aufsteigenden Fasern enden im breit angelegten Koniokortex von Primaten in räumlich definierten Zonen an Körnerzellen der dichtgepackten Schicht IV und an tiefer (innen) gelegenen Pyramidenzellen von Schicht III.

Beim relativ dünn angelegten, agranulären (ohne Schicht IV) Pyramidenkortex des Delphins dagegen steigen die Thalamusfasern bis in die zellarme Schicht I auf und verzweigen sich dort weitläufig tangential. Hier greifen tiefer gelegene Nervenzellen (extravertierte Neuronen in Schicht II und Pyramidenzellen in den Schichten III und V) die eingehende Erregung dann axodendritisch ab, d.h. thalamische Axone kontaktieren vorzugsweise in Schicht I die Dendriten kortikaler Neuronen (Deacon 1990; modifiziert durch J. S. Oelschläger).  
I-VI: Hirnrindenschichten I bis VI.

Auf diese Weise erregen beim Zahnwal (Delphin; Abb. 4.4-2) die horizontal verlaufenden Thalamusfasern in Schicht I über axodendritische Verknüpfungen (sogenannte „Synapses en passage“) viele einzelne Apikaldendriten sowohl von extravertierten Neuronen in Schicht II als auch von tiefer gelegenen Pyramidenzellen in den Schichten III und V. Über die Axone der extravertierten Neuronen ("everted neurons"; Glezer et al. 1988) und die Apikaldendriten der tiefer gelegenen Pyramidenzellen wird die Erregung anschließend in tiefere Kortexregionen (Schichten III, V, VI) weitervermittelt (Sanides und Sanides 1972; Ferrer 1987; Ferrer und Perera 1988; Glezer und Morgane 1990; Glezer et al. 1991; Valverde et al. 2002; Marino 2007).

Neben Schicht I soll auch Schicht III (bisweilen im Verbund mit Schicht V) als zusätzliche Schaltstation für ankommende Thalamus-Erregungen dienen (Glezer und Morgane 1990; Glezer et al. 1991, 1998; Hof et al. 2005). Die Analyse von Cytochrom-Oxidase-Färbungen an Kortexprouben von Tümmler und Schweinswal hat gezeigt, dass ein Maximum an Enzym-Labeling in Schicht III (teilweise auch in V) auftritt, während Schicht I schwächer markiert ist (Garey und Revishchin 1988, 1990; Revishchin und Garey 1990, 1991; Glezer et al. 1992, 1998). Dabei deutet eine erhöhte Cytochrom-Oxidase-Aktivität allgemein im Säugerkortex auf einen gesteigerten Energieumsatz vor allem in afferenten thalamischen Endverzweigungen (Terminationen) von Axonen hin (Hubel und Wiesel 1968; Wong-Riley 1979; Horton und Hubel 1981; Braitenberg 1985; Peters et al. 1989). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen routinehistologischen und immunhistochemischen Befunde stützen die bisher an Zahnwalen gewonnenen Daten: die im Nissl-Zellbild erkennbare Schicht I wirkt in allen Arealen sehr breit und zellarm. Schicht II ist dagegen schmal und dicht gepackt mit zahlreichen extravertierten Neuronen. Die Morphologie dieses besonderen Zelltyps zeigt in der Golgi-Färbung, dass hier die Apikaldendriten dichotom geteilt in Schicht I hineinragen. Es scheint, als würden diese Zellen ankommende Information über ihre Apikaldendriten "abgreifen" und die Erregung über vertikale Axone an tiefer gelegene Schichten weiterreichen. Doch auch Schicht

III zeigt interessante Charakteristika: ihr Reichtum an Pyramidenzellen (als möglichen Rezipienten von thalamischem Input, s.u.) und die nur vereinzelt auftretenden, großen multipolaren Zellen finden sich prinzipiell in sämtlichen bearbeiteten Arealen (M1-V1), doch zeigt die stereologische Feinanalyse, dass sich diese Areale gerade in Schicht III hinsichtlich ihrer Zelldichte konsistent unterscheiden (vgl. Kap. 3.6). Dabei ist festzuhalten, dass gerade jene Areale, die bei Primaten einen besonders massiven thalamischen Input empfangen (vor allem A1 und V1), hier deutlich koniokortikal organisiert sind (gut bis extrem stark entwickelte Körnerzellschicht IV, vor allem in V1). Interessanterweise zeigen diese Areale (A1, V1) auch beim Delphin trotz aller offensichtlichen Unterschiede zur Situation bei Primaten (Fehlen der Schicht IV, massives Auftreten von mittelgroßen und großen Pyramidenzellen) in der Schicht III deutlich höhere Zelldichten als ein vermeintlich weniger Thalamus-abhängiges, primär-projizierendes Areal wie M1. Das Areal S1 steht mit Blick auf die Qualität seiner thalamischen Anbindung möglicherweise zwischen diesen beiden ‚Extremformen‘ A1/V1 einerseits bzw. M1 andererseits. Dass diese modalitätsspezifischen Unterschiede gerade für Schicht III charakteristisch sind, könnte als Hinweis auf die Einspeisung eines bedeutenden Teils der thalamokortikalen Projektionen in diese Schicht verstanden werden. Mithin könnte dem Phänomen der kortikalen Granularität (also dem Vorhandensein unzähliger kleiner bis sehr kleiner multipolarer Körnerzellen in Schicht IV) bei Landsäugetieren im Falle des Delphins mit seiner kortikalen Pyramidisierung gewissermaßen eine „pyramidale Granularität“ entsprechen. Anders gesagt, könnten die beim Delphin massenhaft vorhandenen, aber größeren Pyramidenzellen der mittleren Kortexschicht III (bei einer lebensraumbedingt anders gelagerten physiologischen Charakteristik) im Sinne einer thalamokortikalen Kopplung dem Koniokortex ("Zell-Sand" in der vorhandenen Körnerzellschicht IV) bei Landsäugetieren ein Stück weit entsprechen.

Evolutionsbiologisch gesehen handelt es sich hierbei möglicherweise um eine gewisse Analogie zwischen Zahnwalen und landlebenden Säugetieren, deren funktionelle Bedeutung bislang jedoch weitgehend unverstanden scheint (s. Kap. 4.4). Die maximale Zelldichte in Schicht III des visuellen Areals V1 sowohl beim Schweinswal als auch beim Tümmler deutet überdies daraufhin, dass hier unter allen primären Rindenarealen das visuelle System vergleichsweise aufwendig organisiert ist. Offenbar erfordert das visuelle System eine relativ höhere Komplexität sowohl in

der Zahl der kortikalen Bausteine als auch im Grad von deren Verschaltung. Glezer et al. (1998) haben bei einem Tümmler das auditorische Areal mit dem visuellen Areal verglichen und ebenfalls festgestellt, dass in der grauen Substanz des visuellen Kortex (V1) die Neuronendichte im Durchschnitt höher ist als im auditorischen Kortex (A1): die Autoren berichten von 41,4 Mio. Neuronen pro cm<sup>3</sup> in V1 gegenüber 37,3 Mio. Neuronen pro cm<sup>3</sup> in A1 (Glezer et al. 1998). Diese Zahlen passen gut zu den in der vorliegenden Arbeit stereologisch ermittelten Werten für Schicht III beim Tümmler: 40,8 Mio. Neuronen/cm<sup>3</sup> in V1 und 31,9 Mio. Neuronen/cm<sup>3</sup> in A1. Bei Primaten liegt eine vergleichbare Situation vor: Die von Glezer und Kollegen durchgeführte Untersuchung hat im Vergleich des Tümmlers mit dem Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) gezeigt, dass bei letzterem im Kortex von V1 die Neuronendichte etwa doppelt so hoch ist wie in A1: 113,4 Mio. Neuronen/cm<sup>3</sup> in V1 gegenüber 61,2 Mio. Neuronen/cm<sup>3</sup> in A1 (Glezer et al. 1998)). Eine Reihung der primären Kortizes nach ihrer Neuronendichte in Schicht III bzw. ihrer kortikalen Komplexität ergibt bei unseren beiden Zahnwalen (Schweinswal, Großer Tümmler) folgende Sequenz: M1 < S1 < A1 < V1. Glezer und Kollegen hatten dies für die durchschnittliche Dichte der grauen Substanz in A1 und V1 beim Tümmler und Makaken gezeigt. Und die vorliegende Arbeit bestätigt und präzisiert diese Befunde durch die stereologische Feinanalyse der Laminae III und V (s. Kap. 3.6 und Kern et al. 2011), bei der sowohl beim Schweinswal als auch beim Tümmler die Dichte wiederum in der Reihenfolge M1 < S1 < A1 < V1 zunimmt. Dass beim Tümmler in V1 auch Schicht V (im Vergleich mit anderen Arealen) eine besonders hohe Neuronendichte aufweist, könnte mit dem offenbar vergleichsweise gut entwickelten Sehsinn dieser Spezies zusammenhängen (Oelschläger und Oelschläger 2009, Kern et al. 2011). Der starke thalamische Input erfolgt hier offenbar nicht nur über Schicht I, sondern wird wahrscheinlich auch auf das Relikt einer im Kortex des Jungtiers noch erkennbaren Schicht IV (s. o.) übertragen. Bislang ist unklar, inwieweit diese (ursprünglich Schicht IV zugehörigen) Neuronen des Jungtiers während der abschließenden Reifung des Neokortex bis zum Adultus als multipolare bzw. als (modifizierte) kleine Pyramidenzellen in die benachbarten Schichten III und V aufgenommen werden oder ob sie ausgemustert und durch kleine Pyramidenzellen funktionell ersetzt werden. Dass im auditorischen Kortex (A1) vornehmlich Pyramidenzellen [und nicht bedornte Sternzellen wie im visuellen Kortex V1, s.o.] einlaufenden thalamischen Erregungen als Rezipienten dienen können, hat

eine Forschergruppe um Philip Smith und Luis Populin in Studien an der Katze gezeigt: hier dominieren in den mittleren Schichten III und IV des auditorischen Kortex nicht die bedornten Sternzellen, sondern typische Pyramidenzellen, welchen eine ähnliche Funktion zukommt wie den bedornten Sternzellen des visuellen Systems, die Aufnahme der eingehenden exzitatorischen thalamischen Projektionen in den Kortex (Smith und Populin 2001). In diesem Kortexareal (A1) sind also bedornte Sternzellen kaum vorhanden, sondern hauptsächlich durch (bedornte) Pyramidenzellen ersetzt. Es ist daher vorstellbar, dass die geringe bis fehlende Granularisation in den primär-afferenten Arealen des Neokortex bei Zahnwalen bzw. die weitgehende bis absolute Dominanz der Pyramidenzellen bei Zahnwalen mit einer Überprägung des gesamten Kortex durch solche Bauprinzipien verstanden werden muss, welche für den *auditorischen Kortex* bei Säugetieren allgemein charakteristisch sind. In dieser Lesart würden dann die morphologischen Unterschiede zwischen dem primär-auditorischen (A1) und dem primär-visuellen Areal (V1) auf verbliebene physiologische Unterschiede der beiden Sinnessysteme hinweisen. So ist das auditorische Areal bei Säugetieren (s. Kap. 3.1.3) einerseits durch eine vertikale Streifung (Regentropfenmuster; raindrop pattern) gekennzeichnet, andererseits durch eine im Vergleich zum visuellen Areal eher moderat ausgeprägte Granularität in Schicht IV. Zwar sind bei den Primaten Mensch und Gorilla in Schicht IV von A1 einige wenige Körnerzellen erkennbar, der Hauptanteil der Neuronen scheint jedoch pyramidalen Charakter aufzuweisen. Auch bei anderen terrestrischen Säugetieren wie dem Hund, einem Vertreter der Carnivora (Fleischfresser), dem Schwein und dem Schaf als Vertretern der Artiodactyla (Paarhufer) sowie anderen Arten von Delphinen (s. Kap. 3.2) ist dieser Trend zur Pyramidisierung von A1 deutlich sichtbar. Das von Smith und Populin beschriebene Prinzip scheint also neben der Katze auch für die hier untersuchten Säuger zu gelten und stellt somit möglicherweise *ein universaltypisches Kriterium für den primär-auditorischen Kortex bei Säugetieren im Allgemeinen* dar.

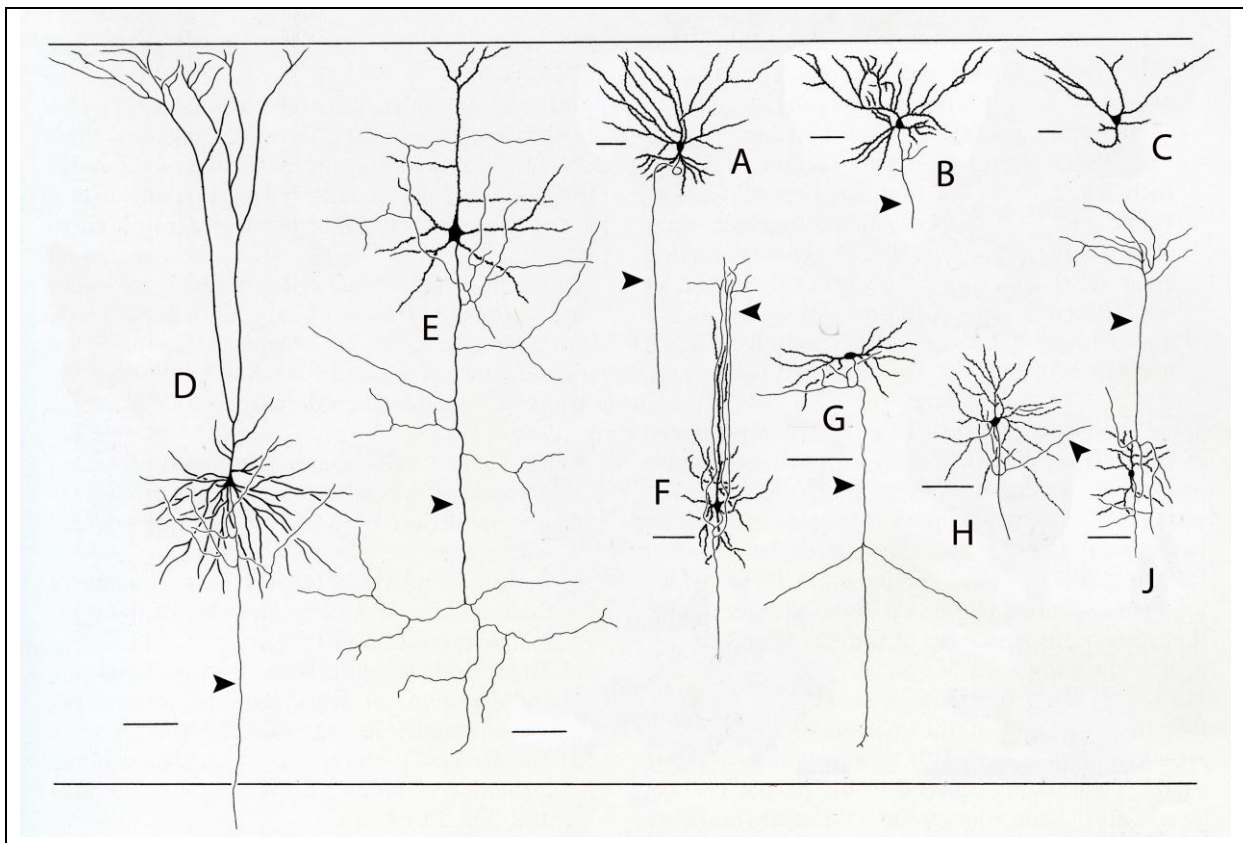
Darüber hinaus enthält der Unterschied zwischen den Arealen A1 und V1 hinsichtlich der Identität und Komposition der thalamorezeptiven Schichten III und IV auch eine phylogenetische Dimension. Diese betrifft vor allem die Entwicklung der bedornten Sternzellen (spiny stellate cells) als einem hochspezialisierten Zelltyp. Das von einigen Autoren beschriebene theoretische Konstrukt des sog. "pyramidalen Kontinuums" besagt erstens, dass sämtliche exzitatorischen Zellen (mit bedornten

Dendriten) im Neokortex aus einer ihnen gemeinsamen Vorläuferpopulation von Neuronen entstanden sind (Fairén et al. 1984, Nieuwenhuys 1994, Smith und Populin 2001). Es besagt zweitens, dass diese Vorläuferzellen gemäß den funktionellen Anforderungen in verschiedenen Neokortex-Arealen und in unterschiedlichen Stammeslinien von Säugetieren unterschiedlich angepasst worden sind. Als möglicher Typus von ursprünglichen Vorläufer-Zellen sollen klassische (typische) Pyramidenzellen mit ihrer spezifischen Morphologie bzw. Polarität (Apikaldendrit, basales, meist kortikofugales Axon) gelten (vgl. Kap. 3.4.1 sowie Abb. 4.3-2). Daraus sollen sich zum einen in manchen nicht-koniokortikalen Rindenarealen sog. "extravertierte" Neuronen entwickelt haben, welche ihre Dendriten auf charakteristische Weise schräg zur Kortexoberfläche hin in eine ursprüngliche ‚plexiform‘ genannte Schicht (bei Säugetieren Schicht I, Lamina molecularis) hinein entsenden (s. Abb. 3.4-5). Diese extravertierten Neuronen wurden früher des öfteren als "primitiv" bezeichnet (Kesarev und Malofeyeva 1969; Kesarev 1970, 1971; Morgane und Jacobs 1972; Preobrashenskaja et al. 1973; Kesarev et al. 1977; Bullock und Gurevich 1979; Morgane et al. 1986c; Glezer et al. 1988). Mit der Ausbildung von dickeren, mehrschichtigen und koniokortikalen Arealen und daraus resultierenden kürzeren intrakortikalen Projektionsstrecken sollen zum anderen die bedornten Sternzellen (spiny stellate cells) entstanden sein. Diese teilweise massenhaft vorhandenen kleineren und kleinsten multipolaren Neuronen in speziellen Schichten (layer IV, teilweise layer III) müssen als Rezipienten der thalamokortikalen Projektionen aufgefasst werden (White 1978; Livingstone und Hubel 1982; Peters und Jones 1984; White 1989; DeFelipe und Farinas 1992; Huntley et al. 1994; Nieuwenhuys 1994; Valverde et al. 2002): offenbar wurde der Apikaldendrit einer solchen Zelle dünn und stark verkürzt. Daraus resultiert ein multipolar-sternförmiger Zelltyp mit gleich langen, dünnen und radiär angeordneten Dendriten sowie einem ovoiden Soma. Überdies hat das Axon seine ursprüngliche Länge eingebüßt und sendet die Informationen nun lediglich intrakortikal in nahegelegene Regionen bzw. Schichten (Nieuwenhuys 1994). Damit wurde der Aktionsradius dieser Zellen stark eingeschränkt. Mit zunehmender Spezialisierung des Kortex (und der Ausbildung hochabgeleiteter primär-rezeptiver Felder) haben die exzitatorischen Zellen also eine Entwicklung hin zu den bedornten Sternzellen durchlaufen, und zwar vermutlich im Zusammenhang mit einem Trend der



zunehmenden Feinanalyse durch die stark vermehrten thalamischen Rezipienten innerhalb des Kortex (Nieuwenhuys 1994).

In Abbildung 4.3-2 sind die wesentlichen Neuronentypen des pyramidalen Kontinuums synoptisch dargestellt: extravertierte Neuronen mit bedornten Dendriten, typische (bedornte) Pyramidenzellen und bedornte miniaturisierte Sternzellen.



**Abb. 4.3-2: Zelltypen des pyramidalen Kontinuums bei verschiedenen Säugern.**

Extravertierte Neuronen am Beispiel von Igel (A), Ratte (B) und Delphin (C) galten bislang als ursprünglich. Typische Pyramidenzellen sind dargestellt am Beispiel von Katze (D) und Maus (E), bedornte Sternzellen am Beispiel des Makaken (G,J) und der Katze (H). Als Übergangsform zwischen den typischen Pyramidenzellen (D, E) und den bedornten Sternzellen (G, H, J) gelten die wegen ihrer Dendritenverzweigung als "Stern-Pyramidenzellen" (star pyramids) bezeichneten Neuronen, hier gezeigt am Beispiel des Totenkopfförmchens (F). All diese Zellen sind exzitatorisch, jedoch unterscheiden sie sich deutlich in der Form sowie in der jeweiligen Reichweite und damit auch den "targets" ihres Axons (letzteres jeweils markiert durch Pfeilspitzen). Weitere Erläuterungen siehe Text. Maßstab jeweils 100 µm. (Modifiziert nach Nieuwenhuys 1998)

Das Prinzip der Feinanalyse mit Hilfe der als abgeleitet geltenden bedornten Sternzellen wird am Beispiel von V1 besonders deutlich: dieses Kortexareal, speziell seine Schicht IV, erhält thalamischen Input aus beiden Augen. Einzelne Zellen dieser Schicht agieren zunächst rein monokulär (also dem Stimulus eines Auges folgend). Erst durch die Projektion der thalamokortikalen Erregung in die darübergelegenen

Schichten III und II, d.h. die Einspeisung monokulärer Information in ein Netzwerk aus Fortsätzen (Axone, Dendriten) vieler anderer Zellen kann die eingegangene Information so verrechnet werden, dass Binokularität (als die gemeinsame Verrechnung der Stimuli beider Augen) entsteht (Hubel und Wiesel 1962, 1968, 1972; Lund und Boothe 1975; Lund et al. 1979; Gilbert und Wiesel 1983; White 1989; Smith und Populin 2001). Im Gegensatz hierzu steht die Akustik: auditorische Reize, zunächst von beiden Ohren unabhängig voneinander (monaural) verarbeitet, werden bereits auf Höhe des Hirnstamms (also weit unterhalb ihrer Einspeisung in Neuronennetzwerke des Neokortex) in binaurale Eindrücke integriert (Verrechnung der akustischen Eindrücke beider Ohren). Schon hier erfolgt also jener Schritt der neuronalen Verarbeitung, welchen die optische Modalität erst auf Höhe des primär-visuellen Kortex V1 erfährt. Demzufolge müssen die Rezipienten des auditorischen thalamokortikalen Input in den Schichten III und IV ihre Information (im Gegensatz zur Situation im visuellen System) nicht in höhere Kortexhorizonte (Schicht II und obere Anteile von Schicht III) projizieren (Smith und Populin 2001). Die intrakortikale Wegstrecke des akustischen Input ist demzufolge kürzer und erfordert nicht die koniokortikale Ausstattung des Kortex mit vielen kleinen bedornten Sternzellen für die kleinteilige lokale Verarbeitung wie im visuellen Kortex. Demzufolge ist bei allen bisher untersuchten Landsäugetieren einerseits die Granularität des auditorischen Kortex weniger deutlich ausgeprägt und andererseits dominieren hier typische Pyramidenzellen als Rezipienten für thalamokortikalen Input. In diesem Zusammenhang wird auch die deutliche kolumnäre bzw. vertikale Organisation der auditorischen Rinde verständlich (im Nissl-Zellbild als auffälliges Regentropfenmuster erkennbar), welche im Gegensatz zu der eher laminär-horizontalen Organisation der visuellen Rinde steht (im Nissl-Zellbild v.a. bei Primaten als komplexe Sublaminierung von Schicht IV erkennbar).

Hinsichtlich der Frage nach der Einordnung der Kortexstruktur bei den Zahnwalen (Delphinen) ist festzuhalten, dass das weitestgehende Fehlen von bedornten Sternzellen im auditorischen Kortex (Agranularität) und die damit korrelierende Pyramidisierung des Delphinkortex in sämtlichen untersuchten Arealen -auch im primär-rezeptiven Areal A1- sehr gut in das „pyramidale Kontinuum“ von Smith und Populin (2001) passen. Offenbar haben auch im Areal A1 des Delphins typische Pyramidenzellen und bisweilen auch die in Schicht II lokalisierten extravertierten Neuronen die Funktion der bedornten Sternzellen in den Schichten des thalamischen

Inputs übernommen. Der postulierte phylogenetische Trend in Richtung der hochspezialisierten, miniaturisierten bedornten Sternzellen, welcher v.a. für Primaten typisch ist, wurde hier möglicherweise ausgesetzt, umgangen, oder nur zu einem sehr geringen Maße realisiert. Bei Zahnwalen spielt der primär-akustische Kortex, ähnlich wie bei Landsäugetieren, angesichts der aufwendigen vorgezogenen Verrechnung auf Hirnstammniveau für die Feinanalyse des akustischen Input eine eher untergeordnete Rolle. Damit scheint hier auch die Projektion thalamischer akustischer Erregungen in höhere Schichten (zur detaillierteren Verarbeitung) von eher geringerer Bedeutung. Vielmehr weist das Prinzip der Pyramidisierung und Vertikalisierung (zusammen mit der Abwesenheit von Granularität) daraufhin, dass die kortikale Verarbeitung des Input hier eher auf eine Grobanalyse hinausläuft (siehe unten), zugunsten einer besonders schnellen und starken Verknüpfung von Präzision (Echolokation, Sonar) und Massenbewegungen (*“akustikomotorische Navigation“*; vgl. Oelschläger 2008). Diese Phänomene können nur als Teil eines Szenarios verstanden werden, welches die Anpassung der Vorfahren der Delphine an die physikalischen Parameter ihres neuen, aquatischen Lebensraums zum Gegenstand hat (Huggenberger 2008; Oelschläger 2008; Oelschläger et al. 2008; Huggenberger et al. 2009; Oelschläger und Oelschläger 2009; Oelschläger et al. 2010; Kern et al. 2011).

Es ist bislang unklar, inwieweit im Kortex des Delphins die Neuronen einer ursprünglich offenbar vorhandenen granulären Schicht IV in die benachbarten Schichten III und V aufgenommen worden sind und auf welche Weise sie eventuell modifiziert werden mussten. Weiter ist zu fragen, ob und wie der hier absolut dominierende akustische Input (über den auditorischen Kortex hinaus) die Morphologie des Neokortex insgesamt beeinflusst hat. Als sehr wahrscheinlich muß gelten, dass über diese charakteristische Dominanz des auditorischen Systems eine weitgehende Uniformität des Zahnwalkortex zustandekam, welche die früheren Untersucher immer wieder verblüfft und teilweise ratlos gemacht hat (vgl. Kap. 1.2). Weiterhin kann als sehr wahrscheinlich gelten, dass der exzitatorische thalamische Input bei Zahnwalen generell sowohl über Schicht I als auch über Schicht III (und bis zu einem gewissen Grad auch Schicht V) in den Neokortex gelangt, und zwar hauptsächlich über Zellen mit pyramidalem Charakter (extravertierte Neuronen und typische Pyramidenzellen), und eher nicht über den bei Landsäugetieren (v.a.

Primaten) teilweise massenhaft auftretenden, spezifischen Typus der miniaturisierten bedornten Sternzellen.

Inwieweit sich Unterschiede in der kortikalen Neuronendichte einzig über Unterschiede in der Anbindung des Kortex an thalamische Eingänge erklären lassen bzw. wie stark intrakortikale (also intrinsische) Verschaltungen hierbei eine Rolle spielen können, soll im nächsten Abschnitt genauer beleuchtet werden - anhand einer morphologischen und immunhistochemischen Analyse der Interneuronen im Zahnwalkortex.

#### **4.3.1.2 Die intrinsische Verschaltung**

Dieses Zwischenniveau in der kortikalen Verrechnung ist für die Informationsverarbeitung von entscheidender Bedeutung. Hier zeigen sich dementsprechend bei den verschiedenen Säugetiergruppen auch besonders deutliche Unterschiede, welche neben neurobiologischen auch evolutionsbiologische Implikationen aufweisen.

Die Betrachtung der neurobiologischen Prozesse in der primär-visuellen Hirnrinde von Primaten macht deutlich, dass dieses Areal V1 in dieser Tiergruppe (inklusive des Menschen) ein Höchstmaß an Komplexität bei der intrakortikalen Analyse und Informationsverarbeitung visueller Information besitzt: so übertrifft die Zahl der Neuronen in Unterschicht IVc $\beta$ , der Hauptlokalisation der bedornten Sternzellen und damit auch dem Haupteingang thalamischer Projektionen, die Zahl der im Thalamus sitzenden Ursprungsneuronen um den Faktor 30:1 (Barlow 1981). Es existieren also 30 mal mehr Neuronen im Zielareal des Kortex (V1) als es sendende Neuronen im Ursprungsgebiet des Thalamus (parvozelluläre Anteile des Corpus geniculatum laterale) gibt (Lund 1984; Rager et al. 2004). Dieser bemerkenswerte Befund wird als strukturelles Korrelat einer aufwendigen Feinanalyse der eingehenden Sinnesreize innerhalb des primär-visuellen Kortex gewertet (Barlow 1979, 1981). Über kurze feine Axonkollateralen leiten die Sternzellen in Lamina IVc $\beta$  die visuelle Information weiter in die supragranulären Schichten II und III, von wo aus sie auf nachgeordnete Assoziationsareale, also die Area parastriata (sekundär-visuelle Rinde (V2, Brodmann-Feld 18) und die Area peristriata (visueller Assoziationskortex, V3-V5, Brodmann-Feld 19) übermittelt wird (Smith und Populin 2001; Rager et al. 2004; Elston und Rosa 2006; Nassi und Callaway 2007, 2009; Kätzel et al. 2011). Im primär-visuellen Areal V1 finden sich vor allem „*einfache Zellen*“ (simple cells), die in

Lamina IV liegen und speziell auf linienförmige Lichtreize reagieren. „Komplexe Zellen“ (complex cells) dagegen befinden sich außerhalb von Schicht IV, hauptsächlich in den nachgeschalteten Laminae II und III sowie V und VI. Man nimmt an, dass die Axone zahlreicher einfacher Zellen an einer komplexen Zelle enden. Komplexe Zellen reagieren speziell auf die Orientierung und Bewegungsrichtung von Formen im Gesichtsfeld. „Hyperkomplexe Zellen“ (hypercomplex cells) aus den Schichten II, III, V und VI dagegen reagieren nicht nur auf ähnliche Reize wie die komplexen Zellen, sondern werden zusätzlich auch durch Länge, Breite und andere Eigenschaften von Formen gereizt (Hubel und Wiesel 1962, 1968; Felleman und Van Essen 1987, 1991; Rager et al. 2004; Lyon et al. 2010): die Einordnung „einfach“, „komplex“ und „hyperkomplex“ bezieht sich demnach auf den Informationsgehalt eines visuellen Stimulus sowie die Größe eines rezeptiven Feldes (Bereich der Netzhaut, der direkt mit dem Reaktionsmuster einzelner Neuronen korreliert), welche in hierarchisch gegliederten Ebenen durch spezialisierte Neuronen kortikal repräsentiert werden (Hubel und Wiesel 1977; Felleman und Van Essen 1991; Kahle 1975; Rager et al. 2004). Der kortikale Ausgang des primär-visuellen Feldes V1 erfolgt schließlich über Pyramidenzellen der tieferen Schichten V und VI, die ihrerseits Informationen über Axonkollateralen vor allem von Pyramidenzellen der Schichten II und III erhalten. Diese basal gelegenen Pyramidenzellen projizieren in subkortikale Zentren (Colliculus superior, Formatio reticularis und Corpus geniculatum laterale; Nieuwenhuys 1998; Rager et al. 2004; s. Kap. 4.3.1.3). Bei Primaten läuft die Information innerhalb der visuellen Rinde folglich über eine Vielzahl hierarchisch gegliederter neuronaler Netzwerke. Letztere werden interessanterweise mit zunehmender hierarchischer Organisationshöhe immer weniger durch direkten thalamischen Input beeinflusst (Rager et al. 2004), und die Vielzahl der intrakortikalen Verarbeitungsschritte spricht für die komplexe Organisationsform dieses visuellen Kortex im Hinblick auf Integrationsleistungen.

Bei der detaillierten Analyse der Interneuronen anhand der calciumbindenden Proteine Calbindin (CB), Calretinin (CR) und Parvalbumin (PV) ergaben sich folgende interessante Befunde: Durch das immunhistochemische Labeling mit Hilfe von Antikörpern gegen diese drei Proteine lassen sich bei Säugetieren insgesamt ca. 95 % aller GABAergen (also inhibitorischen) Zelltypen erfassen (in vernachlässigbar wenigen Fällen auch Pyramidenzellen), wodurch wertvolle Einblicke in das hemmende Netzwerk kortikaler Interneuronen möglich werden (Hendry et al. 1989;

Andressen et al. 1993; DeFelipe 1993; Condé et al. 1994; Alcantara und Ferrer 1995; DeFelipe 1997; Gonchar und Burkhalter 1997; Glezer et al. 1998; Morrison et al. 1998; Hof et al. 1999; DeFelipe 2002; Markram et al. 2004; Hof und Sherwood 2005; Wonders und Anderson 2006; Gonchar et al. 2007; Hof und Sherwood 2007; Ascoli et al. 2008; Jones 2009; Sherwood et al. 2009). Quantitativ gesehen machen bei Säugern alle GABAergen Interneuronen zusammen ca. 15-30 % *aller* Neuronen im Neokortex aus (also Pyramidenzellen *und* Interneuronen) (Nieuwenhuys 1994; Gonchar und Burkhalter 1997; DeFelipe 2002; Wonders und Anderson 2006; Gonchar et al. 2007; Jones 2009). Dabei sind CB- und CR-exprimierende Neuronen, bei denen diese Antigene nur äußerst selten im selben Neuron ko-lokalisiert sind, einander in morphologischer Hinsicht relativ ähnlich: meist handelt es sich um bipolare Neuronen (vgl. Abb. 3.4-1 und 3.4-7) oder Doppelbuschzellen (vgl. Abb. 3.4-1 und 3.4-8; Rogers 1992; Alcantara und Ferrer 1995; DeFelipe 1997; Morrison et al. 1998; Gonchar und Burkhalter 1999; Hof et al. 1999; DeFelipe 2002; Markram et al. 2004; Hof und Sherwood 2005; Wonders und Anderson 2006; Gonchar et al. 2007; Hof und Sherwood 2007; Jones 2009; Sherwood et al. 2009). Dagegen handelt es sich bei PV-positiven Zellen meist um Kandelaberzellen (vgl. Abb. 3.4-1 und 3.4-9) und um multipolare Neuronen (bei Primaten und Nagern bisweilen auch Korbzellen genannt, vgl. Abb. 3.4-1 und 3.4-11; Blümcke et al. 1990; Van Brederode et al. 1990; Hof und Nimchinsky 1992; Condé et al. 1994; Alcantara und Ferrer 1995; Nimchinsky et al. 1997; Glezer et al. 1998; Hof et al. 1999; DeFelipe 2002; Markram et al. 2004; Hof und Sherwood 2005; Wonders und Anderson 2006; Gonchar et al. 2007; Hof und Sherwood 2007; Jones 2009; Sherwood et al. 2009).

Bei Primaten kommen CB- und CR-immunreaktive (-ir) Zellen überwiegend in den supragranulären (also oberhalb von Schicht IV gelegenen) Schichten II und III vor. Dagegen treten PV-gelabelte Neuronen gehäuft in den Schichten II bis V auf, mit einem besonders hohen Anteil in Schicht IV, insbesondere in der Unterschicht IVc $\beta$  von V1; hierbei handelt es sich um ein Zentrum der bedornten Sternzellen und damit um einen 'hot spot' von Terminationen thalamischer Afferenzen (siehe oben). Nach einer Studie von Glezer und Kollegen beträgt das Verhältnis von CB- und CR-markierten Zellen (ihrer morphologisch-funktionellen Ähnlichkeit wegen werden diese beiden Zellgruppen jeweils zusammengefasst) zu PV-markierten Zellen (CB+CR/PV) in der primär-visuellen Rinde V1 eines Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) 2,4:1 (Glezer et al. 1998). In diesem zuvor als für Primaten repräsentativ



ausgewählten primär-visuellen Rindenareal V1 sind also CB-ir und CR-ir Zellen zusammen 2,4 mal häufiger als PV-ir - Zellen.

Von diesen Verhältnissen weicht das für den Delphin-Neokortex als repräsentativ ausgewählte Beispiel der primär auditorischen Rinde deutlich ab: es fällt auf, dass dieses Kortexareal A1 beim Delphin insgesamt besonders viele CR-gelabelte Neuronen enthält (s.u.). Die so markierten Zellen befinden sich hauptsächlich in Schicht II sowie teilweise auch in Schicht I und den oberen Anteilen von Schicht III (jeweils als bipolare Zellen); CR-Zellen kommen hier aber auch vereinzelt im Schichtenkomplex III/V vor (jeweils als große multipolare Neuronen) und bisweilen in Schicht VI. PV-positive Neuronen treten beim Delphin (als kleine bi- oder multipolare Neuronen) wiederum hauptsächlich in Schicht II auf sowie spärlich in Schicht I und den oberen Zonen von Schicht III. Vereinzelt sind jedoch auch wenige große multipolare PV-positive Neuronen in den Schichtenkomplex III/V eingestreut sowie in die tiefen Zonen von Schicht V am Übergang zu Schicht VI. Immunreaktionen mit Antikörpern gegen Calbindin lieferten in der vorliegenden Arbeit leider bei keiner der untersuchten Delphin-Proben ein spezifisches Labeling. Eine im Vergleich zur ausgeprägten Reaktion gegen CR deutlich schwächere bis fehlende Immunreaktivität gegen CB wurde auch schon bei anderen Untersuchungen am Delphin-Kortex beobachtet (Glezer et al. 1998; Hof et al. 1999). Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in dem Problem der Beschaffung von gut geeignetem Hirngewebe von Delphinen (s. Kap. 4.1). Damit lassen sich das post- mortem- Zeitintervall (PMI) bis zur Fixation des Gewebes und damit seine potenzielle histologisch-histochemische Qualität mangels adäquater Daten nur schwer einschätzen, weshalb diese Parameter hier tendenziell vorsichtiger zu bewerten sind als bei besser verfügbaren Landsäugetieren. Eine geringere Stabilität des Antigens in CB-ir Zellen kann indessen nicht ausgeschlossen werden. Inwieweit auch das im Vergleich zu Ergebnissen an Landsäugetieren schwächer ausgeprägte Labeling der Markerproteine Calretinin (CR), Parvalbumin (PV) und Neurofilament (NF) in den Kortexpuben der untersuchten Delphine darauf zurückzuführen ist, bleibt unklar.

Eine quantitative Analyse des für den Delphin repräsentativen primär-auditorischen Areals A1 am Beispiel des Tümmlers (Glezer et al. 1998) ergab, dass die Summe der CB- und CR-positiven Neuronen (wegen ihrer morphologisch-funktionellen Ähnlichkeit wurden diese Zellen in Analogie zum Makaken auch beim Delphin in einer Gruppe zusammengefasst) den Anteil der PV-positiven Neuronen im Verhältnis

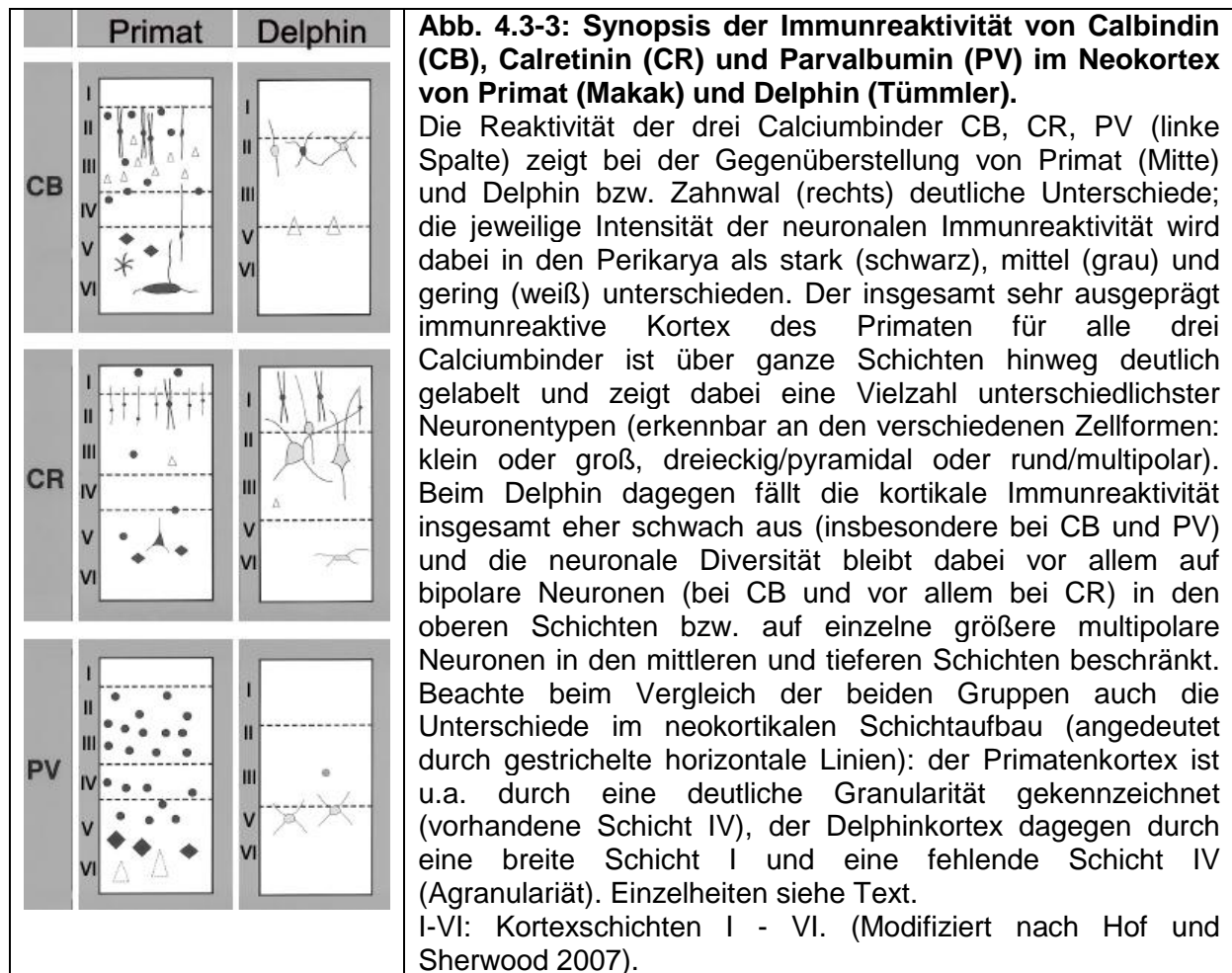
9 : 1 übertrifft (Tab. 4.3-2). Damit scheint das Areal A1 beim Delphin wesentlich stärker Calbindin- bzw. Calretinin-geprägt als das für Primaten repräsentative Areal V1, gezeigt am Beispiel des Makaken (mit einem Verhältnis CB+CR/PV-Neuronen von 2,4 : 1; s.o., Glezer et al. 1998).

Die folgende Tabelle 4.3-2 zeigt eine Zusammenfassung der oben im Text genannten Zahlen (Verhältnis der CB- und CR-markierten Neuronen zu den PV-markierten Neuronen) für die Areale V1 und A1 der beiden 'Säugetier-Repräsentanten' Primat (Makak) und Delphin.

**Tab. 4.3-2** Verhältnis von CB- und CR- markierten Neuronen zu PV-positiven Neuronen (CB + CR / PV) in repräsentativen Arealen eines Primaten (V1) und eines Delphins (A1)

<u>Rindenareal</u>	<u>CB+CR/PV Makak</u>	<u>CB+CR/PV Delphin</u>
Auditorisches Primärfeld (A1)	2,4 : 1	<b>9,0 : 1</b>
Visuelles Primärfeld (V1)	2,4 : 1	<b>4,1 : 1</b>
Quelle: Glezer et al. (1998).		

Auch im Hinblick auf die Lokalisation der Calciumbinder-gelabelten Zellen in den jeweiligen Kortexschichten gibt es grundlegende Unterschiede zwischen den Zahnwalen und den Primaten - solche Unterschiede wurden bisweilen auch schon von früheren Autoren in ähnlicher Weise diskutiert (Garey et al. 1989; Hof et al. 1992; Glezer et al. 1993; Glezer et al. 1998; Hof et al. 1999, 2000; Hof und Sherwood 2005, 2007; Marino 2007). Abbildung 4.3-3 zeigt die Topographie von Calciumbinder-markierten Neuronen im Kortex der beiden Paradigmata Primat (Beispiel: Makak) und Delphin (Beispiel: Großer Tümmler) quasi als Schnittmenge aus den hier erhobenen Befunden und denen anderer Autoren (der Vollständigkeit halber wurde auch das Labeling gegen CB aus der Untersuchung von Hof et al. 1999 miteinbezogen).



Neben der topographischen Lage der GABAergen Neuronen innerhalb des Neokortex sowie ihren zellmorphologischen Charakteristika können für ein Verständnis der CB-, CR- und PV-gelabelten Neuronen auch Spezifika der intrinsischen Kortexverschaltung herangezogen werden. Dabei bieten frühere, teilweise auch elektrophysiologisch orientierte Studien interessante Einsichten zur Funktionsweise dieser Interneuronen (DeFelipe 1989; Alcantara und Ferrer 1995; Gonchar und Burkhalter 1997, 1999; DeFelipe 2002; Wonders und Anderson 2006; Ascoli et al. 2008; Gonchar et al. 2007; Jones 2009). Diese Untersuchungen wurden zwar größtenteils an Primaten und Nagern durchgeführt, doch sind ihre Befunde zum Bau und der Funktion verschiedener Interneuronen wahrscheinlich auch für andere Säugetiere gültig (Garey et al. 1989; Glezer et al. 1993; Hof et al. 2000; Hof und Sherwood 2005; Jones 2009). Die folgende Tabelle 4.3-3 zeigt spezifische Charakteristika von gegen Parvalbumin (PV), Calbindin (CB) und Calretinin (CR) gelabelten Neuronen:

**Tab. 4.3-3** Charakteristika von GABAergen Neuronen im Neokortex von Säugern. Modifiziert nach Wonders und Anderson (2006) und Jones (2009)

Neuronales Markerprotein	Typische Zellmorphologie	Neuronaler Transmitter	Gehemmte Zielstruktur
<b>Calbindin</b>	Doppelbuschzellen	GABA	Dendriten von Pyramidenzellen
	Martinotti-Zellen	GABA	Dendriten von Pyramidenzellen
<b>Calretinin</b>	Doppelbuschzellen	GABA	Dendriten von Pyramidenzellen
	Kleine bipolare Neuronen	GABA	Andere GABA+ Interneuronen (als Hauptziel) und Dendriten von Pyramidenzellen
<b>Parvalbumin</b>	Große multipolare Neuronen	GABA	Dendriten und Somata von Pyramidenzellen
	Kandelaberzellen	GABA	Initiale Axonsegmente von Pyramidenzellen

Gemäß Tabelle 4.3-3 weisen CB- und CR-Neuronen eher einen bipolaren Habitus auf, PV-Neuronen entsprechen dagegen eher multipolaren Neuronen (vgl. Abb. 3.4-1). Calciumbinder-positive Neuronen unterscheiden sich bis zu einem gewissen Grad auch funktionell, und zwar in der Richtung der Ausbreitung ihrer inhibierenden Erregung. CR- und CB- Neuronen (insbesondere jene in den Kortexschichten II und III) scheinen vor allem für die intrakolumnäre/ interlaminäre, also vertikale Inhibition zuständig zu sein (über mehrere Kortexschichten hinweg), PV- Neuronen dagegen (v.a. jene in den Kortexschichten III bis V) eher für die intralaminäre/ horizontale Inhibition (Alcantara und Ferrer 1995; Glezer et al. 1998; Gonchar und Burkhalter 1999). Aus der Funktionalität der jeweiligen Subtypen von Interneuronen (also CR-, CB- und PV-Neuronen) ergeben sich jedoch auch Hinweise auf generelle Muster von Inhibition. So tragen CR-Neuronen durch ihre Fähigkeit der Hemmung anderer inhibitorischer Interneuronen, (v.a. in den Schichten III bis V) innerhalb des Kortex zu zahlreichen einzelnen Disinhibitionen bei (und zwar in einem 5-fach höheren Maß als PV-Zellen vorhanden sind; Gonchar und Burkhalter 1999). Dies bedeutet, dass durch die Aktivität eines CR-Neurons andere benachbarte GABAerge Interneuronen blockiert werden, welche dadurch ihr jeweiliges Inhibitionspotential verlieren. Dadurch können funktionell zugehörige Pyramidenzellen kurzzeitig (indirekt) enthemmt werden, und dann in diesem Zeitfenster aktivierende (exzitatorische) Impulse aussenden (vgl. Abb. 4.4-2). Es resultiert also vor Ort eine zeitlich stark limitierte, lokal erhöhte Erregbarkeit der Pyramidenzellen. Olshausen und Kollegen

sehen am Beispiel des visuellen Kortex von Primaten in den CR-Zellen mögliche Schaltstellen, die aufgrund ihres Potentials zur Erhöhung der lokalen Erregbarkeit von exzitatorischen Neuronen eine entscheidende Rolle bei der aufmerksamkeitsgesteuerten Feinregulierung von visuell induzierten Reizantworten im Kortex spielen dürften (Olshausen et al. 1993). Beim Zahnwal (Delphin) könnte sich diese Disinhibierung bzw. die daraus resultierende Erregbarkeit von Pyramidenzellen darin äußern, dass hier bei exzitatorischem Thalamus-Input ganze Bereiche der Hirnrinde intrakortikal angeregt werden. Der Zahnwal- Kortex reagiert dann möglicherweise 1) durch die über bipolare Calretinin-Interneuronen vermittelte Disinhibierung und 2) die gleichzeitig direkt an exzitatorischen Pyramidenzellen eintreffende thalamische Erregung 3) in Form einer Massenaktivierung von Pyramidenzellen vor Ort und in angrenzenden Bereichen (Morgane et al. 1990; s. Kap. 4.4 und Abb. 4.4-2: i, j). Zum Abschluss käme diese Massenaktivierung dann durch die in der Tiefe liegenden großen multipolaren Interneuronen im Schichtkomplex III/V (PV-positiv und CR-positiv, s. Abb. 4.3-2), welche nach ihrer kurzzeitigen Disinhibition (durch bipolare CR-Interneuronen, s.o.) von rückläufigen Axonkollateralen der projizierenden Pyramidenzellen erregt werden (Rückkopplung: s. Abb. 4.4-2: n). Dabei deutet die radiäre Dendritenverzweigung der großen multipolaren Neuronen eher auf eine horizontal-intralaminär ausgerichtete Hemmung hin (im Gegensatz zu den bipolaren Neuronen und ihrer eher vertikal-kolumnären Hemmung; Alcantara und Ferrer 1995; Gonchar und Burkhalter 1999). Die beachtliche Größe dieser Zellen samt der Tatsache, dass sie ihre "targets" (Zielzellen) oftmals direkt am Zellsoma hemmen (vgl. Tab. 4.3-3), zeugen von einem erheblichen Inhibierungspotential. Nach einem kurzzeitigen lokalen Erregungsfluss stellt sich auf diese Weise schnell wieder ein kontrolliertes Gleichgewicht ein, welches durch (zusätzlichen) exzitatorischen thalamischen Input dann erneut verschoben werden kann. Dabei stehen die PV-Neuronen mit ihren multipolar/radiär ausgerichteten Dendriten und dem damit verbundenen intralaminären Hemmpotential in einem gewissen Gegensatz zu den bipolaren (vertikal inhibierenden) CR-Zellen. Ein besonderes Beispiel von PV- Neuronen liefern neben den großen multipolaren Zellen die Kandelaberzellen (Abb. 3.4-1 und 3.4-9): durch ihren hemmenden Einfluss speziell am initialen Axonsegment von Pyramidenzellen (vgl. Tab. 4.3-3) sind diese Interneuronen sehr stark inhibierend (Alcantara und Ferrer 1995; DeFelipe 2002). Demzufolge haben einzelne Zellen großen Einfluss auf die Entsendung inhibierender

Ströme in die Umgebung, mit einer Reichweite, welche direkt mit der Dimension (Ausbreitung) sowie dem Grad der Verzweigung ihres Dendritenbaums korreliert; mit besonders großem Effekt bei großen multipolaren Neuronen und großen Kandelaberzellen.

***Im Vergleich der primären neokortikalen Rindenfelder der Modellsäuger Primaten und Delphine lässt sich für die intrinsische Verschaltung Folgendes zusammenfassend festhalten:***

Im inhibitorischen Interneuronen-System der Delphine dominieren in den oberen Schichten (v.a. Schicht II) vornehmlich bipolare Zellen. Ihre vertikale Orientierung deutet auf eine ausgeprägte kolumnäre Organisation des Kortex hin. Über die Hemmung anderer GABAerger Neuronen (Disinhibierung) schaffen diese Interneuronen in der Tiefe des Kortex Raum für eine effiziente, aber kurzzeitige exzitatorische Erregungsbildung (pyramidale Massenaktivierung, s. Abb. 4.4-2). Thalamischer Input führt hier zu einer zweigleisigen Aktivierung des Kortex:

- 1) zum einen auf direktem Wege über thalamokortikale Verbindungen zu exzitatorischen Zellen ('extraverted neurons' und Pyramidenzellen).
- 2) Zum anderen trägt der thalamische Input durch die Aktivierung disinhibierender Interneuronen der oberen Schichten I und II (diese Interneuronen blockieren dann große hemmende multipolare Zellen) indirekt zu einer lokalen Enthemmung kleiner Verbände von Pyramidenzellen in den Schichten III bis V bei.

Beendet wird diese lokale Erregung des Kortex dann folgendermaßen: die aktivierten kortikofugal projizierenden Pyramidenzellen sorgen über rückläufig-erregende Axonkollateralen für eine Rückkopplung. Danach können die kurzzeitig gehemmten großen Multipolaren im Schichtkomplex III-V ihren blockierenden Einfluss wieder ausüben und damit die lokale Kortexerregung beenden (s. Kap. 4.3.1.3).

Das Gegengewicht zur lokalen exzitatorischen Erregungsbildung findet sich also in großen multipolaren Interneuronen der unteren Schichten III und V mit ihrem ausgeprägten und weitreichenden Hemmpotential sowohl in der Vertikalen als auch in der Horizontalen. Die genannten Zellen bewirken gemeinsam die restitutive intrakortikale Balance nach der Einwirkung von exzitatorischem thalamischem Input und der kurzzeitigen Disinhibition insbesondere der großen Pyramidenzellen des Schichtkomplexes III-V. Auf diese Weise steht der Kortex nach stattgehabter Erregung sehr schnell erneut für eingehenden Input bereit.



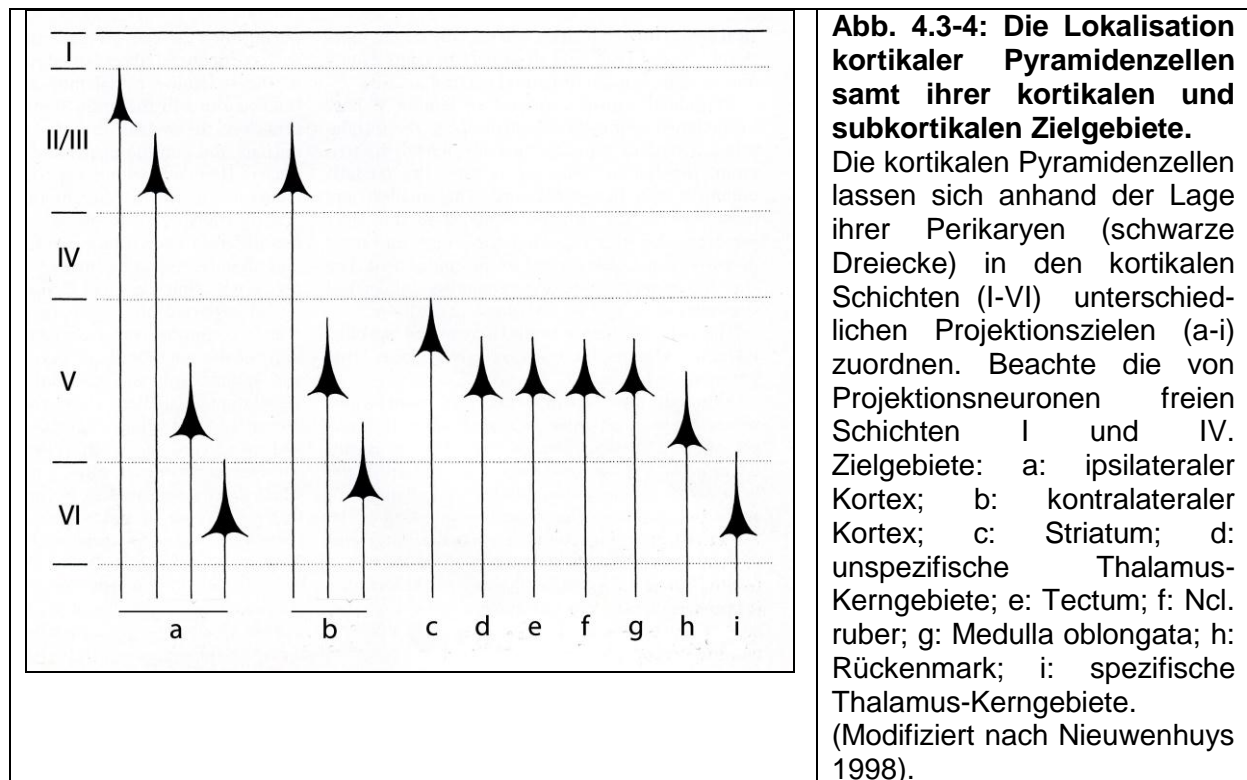
Ziele des kortikalen Outputs, welcher in dem schmalen Zeitfenster von lokaler Erregung nach der geschilderten intrinsischen Signalverarbeitung zustandekommt, sollen im folgenden Abschnitt genauer betrachtet werden.

#### **4.3.1.3 Der kortikale Output**

In der kortikalen Informationsverarbeitung stellt nach dem thalamischen Input und der intrakortikalen Analyse die Generation des Output den dritten und damit letzten Teil der kortikalen Trias dar (core unit). Ziel dieser meist durch typische Pyramidenzellen und deren Axone vermittelten Projektionen ist die Propagierung neuronaler Signale in andere kortikale als auch extra- bzw. subkortikale Regionen. (Glezer et al. 1992; Hof et al. 1992, 1996a, 1999, 2000; Nieuwenhuys 1994, 1998; Nimchinsky et al. 1997; Preuss 2001; Hof und Sherwood 2005, 2007; Marino 2007; Sherwood et al. 2009). Dabei werden diese Projektionen anhand ihrer Zielgebiete in drei Typen eingeteilt: Assoziationsbahnen, Kommissurenbahnen und Projektionsbahnen (Nieuwenhuys 1994, 1998; Rager et al. 2004).

a) Assoziationsbahnen vernetzen verschiedene Kortexareale innerhalb einer Hemisphäre miteinander. b) Kommissurenbahnen dagegen verknüpfen beide Hemisphären miteinander und ziehen dabei meist durch den Balken (Corpus callosum). c) Die Projektionsbahnen schließlich verbinden den Neokortex mit subkortikal gelegen Zentren. Hierbei ist von Bedeutung, dass bei diesen Faserbahnen die Lokalisation der Somata der betreffenden Pyramidenzellen (Schicht bzw. Unterschicht) Hinweise auf die jeweils anvisierten Zielgebiete liefert (Jones 1984; White 1989; Nieuwenhuys 1994, 1998).

Abbildung 4.3-4 gibt eine Übersicht zur kortikalen Lokalisation von projizierenden Pyramidenzellen samt ihrer jeweiligen Zielgebiete.



Insgesamt wird einerseits deutlich, dass Assoziationsbahnen sowohl in den oberen kortikalen Schichten II und III als auch den tieferen Schichten V und VI entspringen (siehe Abb. 4.3-4, a). In ähnlicher Weise entspringen Kommissurenbahnen sowohl in den tieferen Lagen des supragranulär (über L IV) gelegenen Schichtkomplexes II/III als auch von den infragranulären (unterhalb L IV) gelegenen Schichten V und VI (dto., b). Die Fasern für Projektionsbahnen zu subkortikalen Zentren kommen dagegen ausschließlich von den infragranulären Schichten V und VI (dto., c-i). Auf diese Weise werden aus L V und L VI Gebiete wie der unspezifische Thalamus (intralaminäre Kerngruppe), Basalganglien wie der Streifenkörper (Corpus striatum) und die Vormauer (Claustrum), der Mandelkern (Amygdala), Mittelhirn-Bereiche wie das Dach (Tectum mesencephali) samt Vierhügelplatte (Lamina quadrigemina), die Haube (Tegmentum mesencephali) mit dem roten Kern (Ncl. ruber) ebenso angesteuert wie Kerngebiete der Brücke (Pons), des verlängerten Marks (Medulla oblongata) und die graue Substanz des Rückenmarks (Medulla spinalis; Nieuwenhuys 1994, 1998, Rager et al. 2004). Dagegen werden die spezifischen Thalamus-Kerngebiete, also u.a. der seitliche Kniehöcker (Corpus geniculatum laterale), der mediale Kniehöcker (Corpus geniculatum mediale), das Polster (Pulvinar) sowie die vorderen, medialen und seitlichen Thalamuskern (Ncll.

anteriores, mediales et laterales thalami) ausschließlich von Pyramidenzellen aus Schicht VI innerviert.

Fazit: Kortikokortikale Bahnen entspringen einerseits aus den supragranulären (also oberhalb von Schicht IV gelegenen) Schichten II und III, andererseits aus den infragranulären (also unterhalb L IV gelegenen) Schichten V und VI. Die für die kortikothalamische Rückkopplung notwendigen Fasern zu den spezifischen Thalamuskernen entspringen dagegen einzig aus L VI.

Die folgende Tabelle 4.3-4 zeigt die besprochenen drei neokortikalen Fasersysteme mit der Lokalisation ihrer Perikaryen sowie den jeweiligen Zielgebieten:

**Tab. 4.3-3** Details zu den drei Typen von neokortikalen Faserbahnen

<b><u>Fasersystem</u></b>	<b><u>Lokalisation (Schichten) der Ursprungsneuronen</u></b>	<b><u>Zielgebiete</u></b>
Assoziationsbahn	II/III, V, VI	ipsilateraler Kortex
Kommissurenbahn	II/III, V, VI	kontralateraler Kortex
Projektionsbahn	V, VI	subkortikale Kerngebiete

In Abb. 4.3-4 ist zu erkennen, dass weder aus der zellarmen Schicht I (Lamina molecularis) noch aus der körnerzellreichen Schicht IV (Lamina granularis interna) extrakortikal projizierende pyramidale Bahnen entspringen. Demzufolge sind diese beiden Laminae auf afferent-intrinsische Funktionen beschränkt, d.h. auf die Rezeption von thalamischem Input und dessen intrakortikale Verarbeitung (s. o.). Diese assoziativen Verknüpfungen (fibrae arcuatae cerebri, Meynert-Fasern) beziehen sich auf einen Gyrus oder reichen über wenige Gyri hinweg: Sie entspringen hauptsächlich in Schicht III und verlaufen unmittelbar unterhalb von Schicht VI (Rager et al. 2004). Von einigem Interesse ist auch, dass die in solche Assoziationsbahnen integrierten Neuronen mit zunehmender Länge ihrer Projektionen immer tiefere Positionen in Schicht III einnehmen. Dabei sind gerade große Pyramidenzellen im unteren Anteil von Schicht III (L IIIc) vor allem für assoziative Kortexregionen typisch (Braak 1980; Eccles 1984). Bei sehr langen Assoziationsbahnen entspringen die Fasern eher von Perikaryen in den Schichten V und VI (Rager et al. 2004). Dagegen liegen bei Assoziationsbahnen, deren Fasern aus einem Primärfeld in ein Assoziationsfeld projizieren, die Perikaryen der zugehörigen Pyramidenzellen hauptsächlich in Schicht III (bei langen Fasern auch in

Schicht V). Fasern, die in umgekehrter Richtung (aus einem Assoziationsfeld kommend) in ein Primärfeld ziehen, entspringen dagegen hauptsächlich an Pyramidenzellen der Schicht V (Rager et al. 2004). Die Axone all dieser assoziativen Neuronen aus den Schichten III, V oder VI enden dann entweder eher in Schicht IV des Zielgebietes (falls die Fasern aus einem Primärfeld in Richtung Assoziationskortex ziehen), oder eher in Schicht I des Zielgebietes (falls die Fasern aus einem Assoziationskortex kommend in ein Primärfeld ziehen) (Eccles 1984; Rager et al. 2004). Man findet, wie schon oben beim thalamischen Kortexeingang beschrieben, also auch hier das Prinzip einer dual angelegten Termination von kortikopetalen (in den Kortex eintretenden) Fasern: auf diese Weise spielen sowohl Schicht IV als auch Schicht I beim kortikalen Input von thalamischer und auch assoziativer Qualität eine wichtige Rolle.

Für die Kommissurenbahnen sei angemerkt, dass die hierfür zuständigen Ursprungsneuronen im supragranulären (also über Schicht IV gelegenen) Komplex LII/III vornehmlich in den tieferen Anteilen, also eher in Schicht III als in Schicht II, lokalisiert sind (siehe Abb. 4.3-4; Nieuwenhuys 1994, 1998). Der infragranuläre (unterhalb von L IV gelegene) Anteil dieser Bahnen entspringt dagegen zu etwa gleichen Anteilen jeweils aus den Schichten V und VI.

Die Frage nach der für Säugetiere allgemeinen Gültigkeit dieser bisher vor allem für Nager und Primaten beschriebenen Typen des kortikalen Output bleibt in mancher Hinsicht leider ungeklärt. Jedoch ist anzunehmen, dass die zytoarchitektonischen Parameter dieser bislang eher spezie-spezifischen Gesetzmäßigkeiten in ihren Grundzügen für sämtliche Säugetiere Gültigkeit besitzen (Creutzfeldt 1977; Szentágothai 1978; Nieuwenhuys 1994, 1998).

Die oben genannten allgemeinen Kriterien lassen sich mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunden (auf der Basis von Nissl-Färbungen und Immunhistochemie) für Primaten und Delphine klar abgleichen und nachvollziehen: so liefern die Primärfelder im Kortex der Primaten im Großen und Ganzen für alle Aspekte des kortikalen Output ein passendes morphologisches Nissl-Korrelat. Die allgemein gut entwickelten Schichten V und VI sprechen für eine massive Projektion in Richtung der subkortikalen Zentren (maximal im Falle der Betz-Riesenpyramidenzellen in Schicht V im Areal M1, weniger deutlich ausgeprägt in Schicht V der sensorischen Areale S1, A1 und V1). Mit Blick auf Schicht VI und ihrer zentralen Rolle bei der kortikothalamischen Rückkopplung zeigen insbesondere

diese primär-rezeptiven Areale S1, A1 und V1 eine enorm starke Entwicklung. Diese Schicht (LVI) wirkt bei Gorilla und Mensch in S1 und A1 sehr breit angelegt, in V1 dagegen eher schmal, aber dicht. Vereinzelte große Pyramidenzellen untermauern die funktionelle Bedeutung dieser kortikothalamischen Projektionen. Mit Blick auf den kortikalen Output aus den supragranulären Schichten II und III lässt sich für unsere Primaten feststellen, dass auch hier alle oben genannten Aspekte deutlich nachvollzogen werden können. Zum einen wirkt der Schichtenkomplex II/III durchweg sehr breit angelegt (mit Ausnahme einer Verschmälerung samt einer erhöhten Dichte im Areal V1). Zum anderen nimmt mit zunehmender Kortextiefe im Komplex II/III die Größe der Pyramidenzellen zu. Beide Aspekte sprechen mit Blick auf die assoziative und kommissurale Bedeutung der Projektionen aus den Schichten II/III für eine bemerkenswerte Entwicklung dieser beiden Faserbahntypen bei Primaten.

Auch beim Delphin lassen sich die meisten Charakteristika des kortikalen Outputs bei Säugetieren im Nissl-Zellbild nachvollziehen. Wegen der durchgängigen "Uniformität" des Delphin-Kortex können die nachfolgend erläuterten Kriterien mehr oder minder streng für alle untersuchten Primärfelder (M1, S1, A1, V1) gelten. Die zum Teil sehr großen Pyramidenzellen in Schicht V (vor allem in M1 und A1) sprechen arealübergreifend für deutlich angelegte Projektionsbahnen aus diesen Regionen. Eine in allen genannten Arealen sehr breite und auffällige Schicht VI deutet auf eine stark entwickelte kortikothalamische Rückkopplung hin. Beim Delphin sind die assoziativen und kommissuralen Bahnen mit ihren Hauptursprungsschichten II und III (trotz einiger quantitativer Unterschiede) prinzipiell ähnlich organisiert wie bei Primaten. Allerdings ist der Schichtenkomplex L II/III (gemessen an der Gesamtdicke des Kortex) beim Delphin arealübergreifend verhältnismäßig breiter. Auch hier nimmt die Größe der Neuronen in dieser Zone mit zunehmender Kortextiefe zu. Die letztgenannten Aspekte sprechen wiederum für starke assoziative (und teilweise kommissurale) Projektionen aus L II/III sämtlicher Areale M1- V1 in andere Kortexareale (sowohl ipsi- als auch kontralaterale). Allerdings scheint die Bedeutung der kontralateral-kommissuralen Verknüpfung der beiden Hemisphären angesichts eines relativ schwach entwickelten Corpus callosum bei Delphinen generell einigermaßen limitiert (Tarpley und Ridgway 1994; Oelschläger 2008; Oelschläger et al. 2008; Oelschläger et al. 2010). Insgesamt gesehen ist der Ausgang der Hirnrinde beim Delphin in seiner Zytoarchitektonik vergleichsweise stark durch Assoziations- und Projektionsbahnen geprägt.

Diese vergleichend-mesoskopische Analyse des kortikalen Output an Nissl-gefärbten Übersichtspräparaten von Primaten und Delphinen soll nun im Folgenden mit Hilfe des Antikörpers "SMI-32" gegen das Strukturprotein Neurofilament (NF) um eine neurochemisch-funktionale Dimension erweitert werden: auf diese Weise lassen sich Subtypen von Projektionsneuronen eindeutig charakterisieren und analysieren. Wie bereits ausführlich erläutert (für Hintergrundinformationen s. Kap. 2.3-5 und 4.2), tritt Neurofilament im Neokortex meist in großen exzitatorischen Projektionsneuronen vor allem der Schichten III und V mit kortikokortikalen und subkortikalen Zielgebieten auf (Hof et al. 1992, 1996a, 1996c; Preuss 2001; Hof und Sherwood 2005; Sherwood et al. 2009; Ding und Van Hoesen 2010). Neben neokortikalen Pyramidenzellen wurde NF aber auch schon in Purkinje-Zellen des Kleinhirns sowie in magnozellulären Neuronen der Retina und des Corpus geniculatum laterale nachgewiesen (Van der Gucht et al. 2001; Kirkcaldie et al. 2002; Boire et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde der Antikörper gegen NF jedoch speziell zur Charakterisierung von kortikalen Projektionsneuronen verwendet. Auf diese Weise können dem Neokortex, trotz einer gewissen Unsicherheit hinsichtlich der Detektion von NF als einem Zellmarker - die Antikörperbindung und damit die chromogene Immunreaktion sind letztlich abhängig vom Phosphorylierungszustand des eigentlichen Neurofilament-Proteins (s. Kap. 2.3.5) - interessante Informationen entlockt werden, welche zum besseren Verständnis der funktionellen Zusammenhänge beitragen.

Bei einem Primaten (Langschwanzmakak) ergab die Analyse der visuellen Rinde, dass hier der Kortex hinsichtlich der Dichte und Verteilung SMI-32-positiver Neuronen in mehr als 28 unterschiedliche Regionen unterteilt werden kann (Hof und Morrison 1995). Dabei finden sich solche NF-immunreaktiven (NF-ir = SMI 32-positiven) Neuronen vornehmlich in den dem primär-visuellen Areal V1 hierarchisch übergeordneten Arealen (sekundär-visuelle Rinde V2, tertiär-visuelle Rinde V3, quartär-visuelle Rinde V4,...) und hierbei v.a. in den Schichten III (weniger in LIIIa und LIIIb, dafür vermehrt in LIIIc) und teilweise in LV (insbesondere in LVa, weniger in LVb). Das primär-visuelle Feld V1 des Makaken enthält wiederum relativ spärlich verstreute SMI-32-positive Zellen. Diese sind kaum in Schicht III lokalisiert, sondern hauptsächlich in Höhe von Schicht IVb sowie an der Untergrenze von Schicht V (also Schicht Vb), wobei die wenigen großen, multipolaren Neuronen in Schicht IVb "Meynert-Cajal-Zellen" und die einzeln verstreut gelegenen, großkalibrigen Pyramidenzellen in Schicht Vb "Meynert-Solitärzellen" genannt werden.



Auf dieser NF- bzw. SMI-32-basierten Analyse lassen sich also bei Primaten Kartierungen des visuellen Kortex durchführen, welche neben rein morphologischen Charakteristika auch funktionelle Implikationen berücksichtigen. Die SMI-32-ir Neuronen spielen hier eine Schlüsselrolle in der kortikalen Verbreitung von eingehendem Input: die SMI-ir Neuronen der infragranulären (also unterhalb von L IV gelegenen) Schichten V und VI projizieren eher in subkortikale Zielgebiete, während SMI-markierte Neuronen der supragranulären Schichten II und III eher kortiko-kortikal (also assoziativ und kommissural) projizieren (Hof und Morrison 1995). Die Aufgabe der einzig in Areal V1 vorkommenden Meynert-Cajal-Zellen (Schicht IVb) und Meynert-Solitärzellen (Schicht Vb) besteht in der direkten Verbindung von V1 mit hierarchisch weit höher gestellten visuellen Regionen (V4 und V5; V5 entspricht dem mediotemporalen Areal, MT) im Sinne einer unmittelbaren Weiterleitung spezifischer Informationssequenzen unter Umgehung von V2 (Nakamura et al. 1993; Hof und Morrison 1995; Nakamura et al. 2004). Solch ein Auslassen bestimmter Verarbeitungsstellen (in diesem Fall V2) dient wohl in manchen Fällen einem besonders schnellen und direkten Informationstransfer aus dem primär-visuellen Feld in nachgeschaltete, hierarchisch höhere Assoziationsregionen (in diesem Fall V4 und V5).

Allgemein ist festzuhalten, dass die NF- / SMI-32-Immunreaktivität bei Primaten (Beispiel: Makak) in granulären Rindenbezirken (also koniokortikalen Bereichen mit einer deutlichen Schicht IV) wesentlich stärker ausgeprägt ist als in dysgranulären (zarte Schicht IV) oder agranulären Bereichen (fehlende Schicht IV) (Campbell und Morrison 1989; Glezer et al. 1992; Vogt et al. 2005; Ding et al. 2009). Dabei sind SMI-32-positive Neuronen, wie oben am Beispiel der deutlich granulär organisierten visuellen Rinde beschrieben, mit wenigen Ausnahmen (z.B. die Meynert-Cajal-Zellen in L IVb von V1) auf die Schichten III und V beschränkt, wobei die SMI32-Immunreaktivität in Schicht III überwiegt.

Auch im granulär organisierten primär-auditorischen Kortex (Areal A1) des Primaten liegt eine prinzipiell ähnliche Verteilung der SMI-ir Neuronen vor: diese finden sich hier vor allem in Schicht III (v.a. L IIIc) sowie vereinzelt in Schicht V (teilweise auch in L VI) (Hof et al. 1992).

In einer anderen wichtigen Kortexregion, dem Gyrus cinguli („Gürtelwindung“ des limbischen Systems; hier des Menschen), wurden Befunde erhoben, welche von dem oben beschriebenen Muster der NF-Verteilung im visuellen System grundsätzlich

abweicht (Nimchinsky et al. 1997; Vogt et al. 2005). Interessanterweise scheinen diese Befunde speziell mit der Granularität (existierende innere Körnerzellschicht IV) dieser Kortexregion zusammenzuhängen. Daraus ergeben sich interessante Einblicke in den Kontext von Granularität und NF-Immunreaktivität, gerade im Hinblick auf NF-Muster in gänzlich agranulären Rindenarealen wie denen des Delphins.

Der Gyrus cinguli, eine medial über dem Balken gelegene Hirnwindung, umfaßt beim Menschen in seinem vorderen wie auch im hinteren Bereich Areale mit schwacher NF-Immunreaktivität. Im anterioren cingulären Cortex (ACC) weisen zwei Bereiche (Brodmann-Areal 32: dysgranulär; Areal 24c: agranulär) relativ wenige NF-ir Neuronen auf, was der Allgemeinsituation bei Delphinen entspricht (s.o.). Die im menschlichen ACC gelabelten Neuronen sind vor allem in Schicht V (besonders Va) und nur sehr vereinzelt in Schicht III (vornehmlich IIIc) lokalisiert (Nimchinsky et al. 1997; Vogt et al. 2005). Insgesamt gilt dieses Verteilungsmuster der NF-Immunreaktivität als charakteristisch für den Großteil der cingulären Rinde. Ein Überwiegen der SMI-32-ir Neuronen in Schicht Va gegenüber den spärlich markierten NF-Zellen in Schicht IIIc wird von manchen Autoren daher als "cinguläres Leitmotiv" (cingular motif) bezeichnet (Vogt et al. 2005). Abgesehen vom Gyrus cinguli findet sich dieses Leitmotiv auch in Bereichen des Gyrus parahippocampalis (in Fortsetzung des Gyrus cinguli und lateral des Hippocampus), und zwar in der perirhinalen Rinde (Brodmann-Areale 35 und 36), der entorhinalen Rinde (BA 28) sowie der präsubiculären Rinde (BA27) (Campbell und Morrison 1989; Glezer et al. 1992; Kirkcaldie et al. 2002; Rager et al. 2004; Vogt et al. 2005). Interessanterweise sind all diese Gebiete Anteile des limbischen Systems, welches neben den genannten neokortikalen Arealen auch Strukturen wie den archikortikalen Hippocampus (v.a. Ammonshorn), den Mandelkern (Amygdala) und viele weitere Regionen umfasst. Das limbische System spielt eine wichtige Rolle bei komplexen assoziativen Vorgängen innerhalb des Gehirns (Orientierung, Lernvorgänge, Gedächtnis, Emotion, Trieb-, Ausdrucksmotorik) (Rager et al. 2004). Die archikortikalen Anteile des limbischen Systems (archaios, griech: altertümlich) sind phylogenetisch gesehen vergleichsweise ursprüngliche Strukturen der Endhirnhemisphäre, Wegen ihrer "einfacheren" Schichtung (meist drei Schichten) werden sie zum "Allokortex" (allos, griech: anders) gerechnet, zusammen mit dem ebenfalls ursprünglicheren Palaeokortex (Riechrinde). Dagegen wird der

phylogenetisch relativ junge Neokortex (neos, griech: neu) auch Isokortex genannt (isos, griech: gleich), da er prinzipiell einheitlich gebaut und typischerweise sechsschichtig ist (Rager et al. 2004).

Allgemein lässt sich nun mit Blick auf die Granularität einer Neokortex-Region und ihrer jeweiligen NF-Immunreaktivität folgendes festhalten: Bei granulär-koniokortikal angelegten Isokortex-Regionen ist stets eine deutliche Schicht IV vorhanden (z.B. Areale S1, A1, V1 von Primaten), und vor allem in Schicht III (und nur teilweise in Schicht V) liegt eine ausgeprägte SMI-32-Reaktivität vor. Dagegen ist für dysgranuläre (Schicht IV kaum vorhanden) oder agranuläre Areale (keine Schicht IV vorhanden; z.B. in einigen Kortex-Regionen des limbischen Systems bzw. in der Motorik M1) das "zinguläre Leitmotiv" ein zusätzliches Spezifikum, mit einer SMI-32-Immunreaktivität in Schicht V, welche jene in Schicht III deutlich überwiegt (Campbell und Morrison 1989; Glezer et al. 1992; Vogt et al. 2005).

Die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde an Primaten (v.a. Gorilla) bestätigen die oben beschriebenen Möglichkeiten aus der Literatur der neurobiologischen Analyse mit Hilfe des Antikörpers SMI-32. Insbesondere beim Gorilla [wahrscheinlich auch beim Menschen; infolge einer möglicherweise weniger günstigen Gewebeerhaltung hier vielleicht schwächer ausgeprägt; s.o.; vgl. Kap. 2.3.5 und 4.1] zeigt sich das typische Muster der NF-Immunreaktivität: Gerade die granulär-koniokortikalen (primär-rezeptiven!) Areale S1, A1 und V1 zeigen eine deutliche SMI-Reaktion v.a. im unteren Bereich von Schicht III und abgeschwächt in den Schichten IV und V (Abb. 3.5-24 zeigt Meynert-Cajal-Zellen in Schicht IVa und eine Meynert-Solitärzelle in Schicht V des Areals V1 beim Gorilla). Demzufolge scheinen hier aus Schicht III starke kortikokortikale Projektionen zu entspringen (s.o.); Schicht IV wirkt dagegen insgesamt eher schwach bis gar nicht NF-immunreaktiv (v.a. in Areal A1 und V1 beim Gorilla). Die wenigen SMI-32-ir Neuronen in Schicht V sind wahrscheinlich in die subkortikale Anbindung dieser Rindenfelder involviert. Im agranulären, fünfschichtigen Areal M1 beim Gorilla und dem Menschen liegen die NF-gelabelten Pyramidenzellen dagegen hauptsächlich in Schicht V, gemäß dem cingulären Leitmotiv, wie es auch für einige andere nicht-sechsschichtige Kortexregionen (z.B. dem limbischen Kortex) typisch ist (s.o.). Diese gelabelten Pyramidenzellen in L V besitzen große Perikarya und verdeutlichen den kortikofugalen Charakter des primär-motorischen Kortex. Doch auch einige markierte Perikarya in Schicht III sprechen für eine gewisse assoziative und kommissurale Anbindung dieser Region.

Die bisherigen Studien am Neokortex des Delphins haben gezeigt, dass die Verteilung der NF-Immunreaktivität einem monotonen Muster folgt: die SMI-32-markierten Pyramidenzellen liegen in diesem agranulär angelegten Kortex (L IV fehlt) durchweg im Schichtkomplex IIIc/V, und dabei fast ausnahmslos am Unterrand der von L III, im Übergang zu L V (Glezer et al. 1992; Hof et al. 1992; Hof und Sherwood 2005). Dabei ist die Markierung der Neuronen mit Hilfe des Antikörpers gegen SMI-32 allgemein eher undeutlich. In anderen Schichten wie L II, den oberen Anteilen von L III (also L IIIab) und in L VI sind zwar ebenfalls NF-ir Zellen zu finden, jedoch nur in äußerst geringer Zahl. Schicht I enthält keinerlei NF-Immunoreaktivität. Insgesamt gesehen lassen sich beim Delphin mit SMI-32 (im Vergleich zum Zellreichtum des Nissl-Bildes) nur relativ wenige, in Gruppen (Clustern) liegende Pyramidenzellen markieren. Nach Hof und Kollegen könnte dies Ausdruck dafür sein, dass es sich hierbei um eine spezielle Untergruppe efferenter Pyramidenzellen handelt (Hof et al. 1992; Hof und Sherwood 2005). Auch scheint das beim Delphin gleichförmige Markierungsmuster von SMI-32 sowie die generell schwach ausgeprägte Schichtengliederung (gut erkennbar im Nissl-Zellbild) stark an paralimbische Übergangsregionen (also periarchikortikale Rindenfelder des limbischen Systems; Stephan 1960a) bei Primaten (insbesondere dem Menschen) zu erinnern. Diese Übergangsregionen ähneln wegen der hier fehlenden Sechsschichtigkeit allokokortikalen Kortexes und sind nach verschiedenen Autoren phylogenetisch von archikortikalen, also ursprünglichen Vorläuferstrukturen abzuleiten (Glezer et al. 1992; Hof et al. 1992, 2000; Preuss 2001; Hof und Sherwood 2005).

Die hier vorgelegten eigenen Befunde geben diese morphologisch-funktionellen Überlegungen aus früheren anderen Studien anschaulich wieder. Arealübergreifend zeigt die immunhistochemische Analyse der vier primären Kortexfelder beim Tümmler ein uniformes Muster: lediglich im Schichtkomplex IIIc/V lassen sich wenige NF-ir Pyramidenzellen nachweisen. Ihr Reaktionsmuster erscheint dabei nur sehr undeutlich ausgeprägt. In den übrigen Schichten zeigt sich dagegen keinerlei Immunreaktion.

Inwieweit diese wenigen NF-ir Neuronen bei Delphinen eine Sonderform projizierender Pyramidenzellen des hauptsächlich efferenten Schichtkomplexes IIIc/V darstellen und welche lokal-kortikale oder subkortikale Anbindung diesen Zellen zukommt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Allerdings scheint dieses Muster der NF-Immunreaktivität beim Delphin eher nicht dem eines typischen

granulär-koniokortikal angelegten Isokortex von Landsäugetieren (Primat) zu entsprechen. Vielmehr finden sich mit der monotonen NF-Immunreaktivität des Kortex beim Delphin und seiner allgemein agranulär-pyramidalen Bauweise (Schicht IV fehlt) gewisse Übereinstimmungen mit allokortikalen Bereichen des Gyrus cinguli und Gyrus parahippocampalis beim Menschen. Inwieweit diesen morphologischen Charakteristika im Kortex des Delphins auch funktionelle Aspekte entsprechen, muss in der Zukunft genauer analysiert werden. Jedoch legen die vorliegenden morphologischen Ähnlichkeiten mit archikortikalen Bereichen des Menschen zumindest gewisse Übereinstimmungen im kortikalen Verschaltungsprinzip nahe. Und im Umkehrschluss kann gelten, dass die Ausgestaltung des granulär-koniokortikalen Isokortex bei Primaten als einer Maximalvariante (erkennbar in den besonders zahlreichen Unterschichten des Areals V1) eine extrem komplexe und evolutionsbiologisch hoch abgeleitete Rindenform darstellt. Im Vergleich hierzu scheint es sich bei der agranulär-pyramidalen Kortexform des Delphins um eine diametral anders abgeleitete Rindenform zu handeln, deren Charakteristik nicht in einer maximalen Komplexität liegt, sondern ganz im Gegenteil durch eine weitgehende Vereinfachung zustande gekommen ist. Der Verlust von Schicht IV in sämtlichen sensorischen primären Neokortex-Arealen ist (neben anderen wesentlichen Abweichungen in den angrenzenden Schichten III und V) höchstwahrscheinlich Teil einer umfassenden Anpassung an das Diktat des sekundär-aquatischen Lebensraums zu verstehen, dessen physikalische Parameter zu Beginn der Evolution der Wale und Delphine ganz neue, harte Anforderungen an sämtliche Organsysteme dieser Tiere stellte (Oelschläger und Oelschläger 2002; Oelschläger 2008; Oelschläger et al. 2008; Kern et al. 2009; Oelschläger und Oelschläger 2009; Oelschläger et al. 2010). Diese Argumentationslinie wird gestützt durch Deacon (1990) sowie durch die Befunde von Garey und Leuba (1986), welche bei jungen Großen Tümmlern (*Tursiops truncatus*) noch eine Schicht IV im visuellen Kortex fanden. Eine besondere strukturelle bzw. funktionelle Nähe zum Rindentypus des Archikortex, wie von einigen Autoren vermutet und mit einer ursprünglichen Organisationsweise konnotiert (Morgane et al. 1986a, 1986b; Glezer et al. 1988), ist daher für den Neokortex der Zahnwale nicht sehr wahrscheinlich. Dazu passt auch der Bericht von Morgane et al. (1988) über eine Schicht IV sogar in V1 des adulten *Tursiops*, Ergebnisse, die zunächst nicht in das Bild des uniformen und agranulären Neokortex der Zahnwale zu passen scheinen. Dieser scheinbare Widerspruch wird

jedoch im nächsten Kapitel aufgelöst werden, wenn es um einen abschließenden Vergleich zwischen zwei Extremen von Großhirnrinde geht, den Neokortex von Zahnwalen und den von Primaten. Dabei wird der Versuch unternommen, die Schichtengliederung der Kortex mit der potentiellen Verschaltung sowie mit der Lebensweise dieser Säugetiere in Einklang zu bringen. ("Granularität" bei Primaten und bei Delphinen).

#### **4.4 Primaten und Delphine: Zur vergleichenden Evolutionsbiologie und**

##### **Funktionalität des Neokortex bei zwei "Extremformen" von Säugetieren**

Bei schwierigen biologischen Analysen hat es sich bewährt, extreme Sachverhalte quasi "im Lichte der wechselseitigen Erhellung" miteinander zu vergleichen, um zu verstehen, wie die einzelnen Paradigmata ursprünglich entstanden sind.

In unserem Falle sind dies die Primaten und die Delphine: die Primaten haben den Vorteil, dass über ihren Neokortex vergleichsweise viel Information vorhanden ist, während die Hirnrinde der Delphine (Zahnwale) innerhalb der Säugetiere eine vom Brodmannschen Generaltypus stark abweichende Organisation aufweist.

In diesem Sinne liefert eine genaue Betrachtung dieser beiden für uns repräsentativen Neokortexmodelle von Primat und Delphin (s.u.) deutliche Divergenzen sowohl hinsichtlich grundlegender morphologischer Kriterien als auch für potenzielle funktionelle Implikationen.

Wie in den vorhergehenden Kapiteln schon detailliert ausgeführt, lassen sich die beiden Extremformen von Kortex der genannten "Modellgruppen" (terrestrische vs. aquatische Säugetiere) mit Hilfe einer dreigliedrigen Analyse der neokortikalen Verschaltung (*thalamische Einspeisung* [Input], *intrinsische Verrechnung* [Analyse und Vorbereitung der Antwort], *kortikaler Ausgang* [Output]) effektiv charakterisieren und interpretieren.

Die folgende Tabelle 4.4-1 zeigt nun zusammenfassend eine Gegenüberstellung der beiden Kortexformen von Primat und Delphin anhand wesentlicher Parameter:

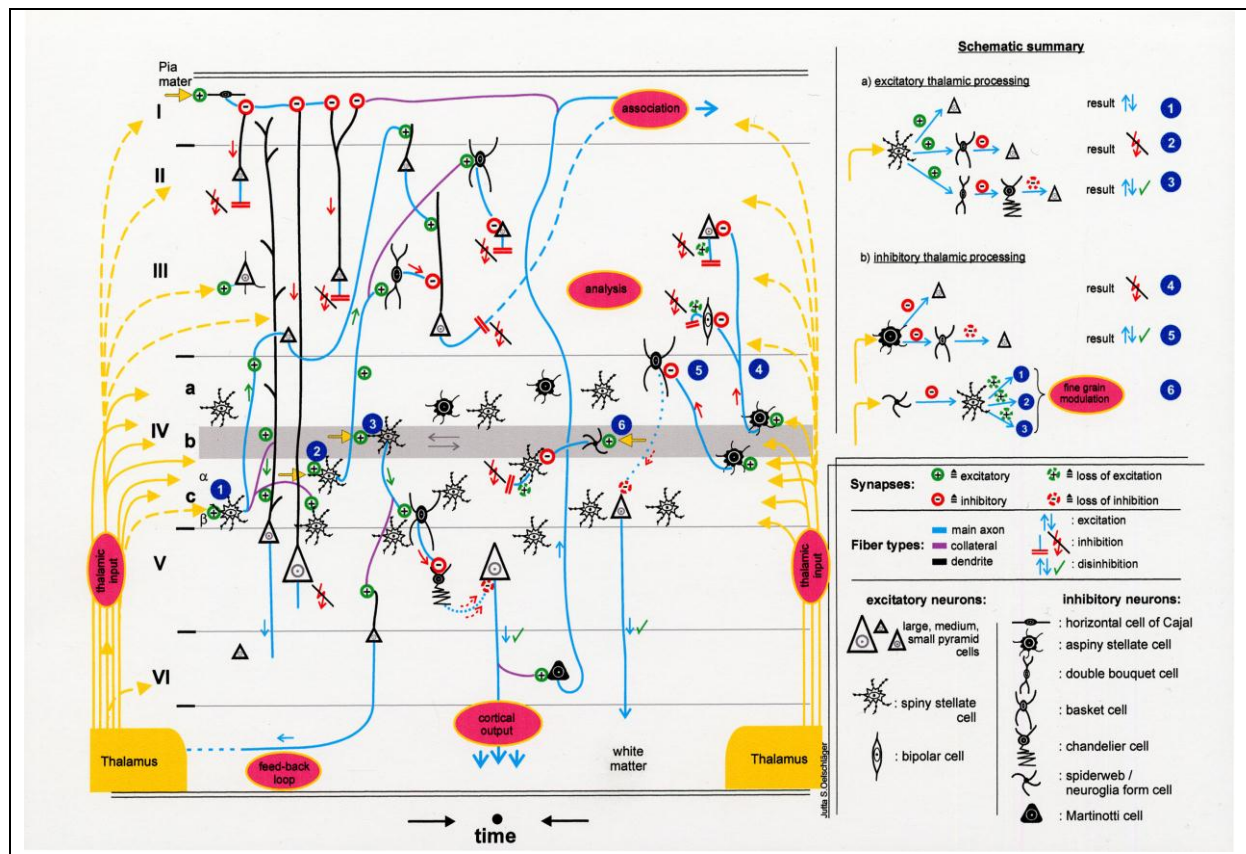


**Tab. 4.4-1** Die beiden Kortexformen von Primat und Delphin in der Übersicht

	Primat	Delphin
Kortextyp	Isokortex (6 Schichten)	“Lepto-/Pyramidenkortex“ (5 [-6] Schichten)*
Feinbauweise	granulär/ koniokortikal (besonders in Schicht IV)	agranulär/ pyramidal (fehlende Schicht IV)
Thalamischer Haupteingang	über Schicht IV; gezielt	über Schicht I; tangential
Intrinsische Verschaltung und Erregungsflüsse	horizontal (intralaminär) und vertikal (intrakolumnär); auf- und absteigend, multidirektional	überwiegend vertikal (intrakolumnär); überwiegend absteigend, unidirektional
Ziel/Funktionalität eines Kortexmoduls	Feinanalyse	Massenaktivierung

\* offenbar gibt es beim Großen Tümmler im primär-visuellen Kortex (V1) auch eine Sechsschichtigkeit (Garey und Leuba 1986; Morgane et al. 1988).  
Leptokortex nach gr. leptós = dünn, fein, zart.

Zur besseren Veranschaulichung ihrer Spezifika geben die schematischen Abbildungen 4.4-1 und 4.4-2 die Struktur und die Prinzipien der Verschaltung des Kortex von Primat und Delphin im Detail wieder.



**Abb. 4.4-1: Schema der intrinsischen Kortexverschaltung bei Primaten.**  
Dargestellt sind die wichtigsten neokortikalen Zelltypen einer Kolumne (Bildlegende s. rechts)

unten) und deren mögliche Interaktionen nach thalamischem Input ("thalamic input" und gelbe Pfeile) zu einem bestimmten Zeitpunkt (schwarze Pfeile und "time", links unter dem Hauptschema). Perikaryen exzitatorischer Zellen schwarz umrandet, inhibitorische Zellen schwarz ausgefüllt. Hauptaxone blau, Axonkollaterale violett, Dendriten schwarz dargestellt. Der potentielle Verlauf der neuronalen Verschaltung innerhalb eines Kortexmoduls (Kolumne) bleibt im Hauptschema auf sechs mögliche Wege (Fallnummern blau unterlegt) beschränkt, die jeweils drei aufeinander folgende Synapsen ("+" mit grüner Umrandung: erregend, "-" mit roter Umrandung: hemmend) umfassen. Die linke Seite des Hauptschemas zeigt die exzitatorische Weitergabe der eingehenden Thalamus-Information (Fallnummern 1-3), die rechte Seite der Hauptdarstellung zeigt die inhibitorische Weitergabe (Fallnummern 4-6). Übergeordnete Aspekte der Kortexaktivität als rote Ovale mit gelber Umrandung. Eine Kurzfassung des Hauptschemas s. rechts oben; die Legende zur Synapsenfunktion, Faser- und Neuronentypen darunter. Ausführliche Erläuterungen zum Schema finden sich im Text. I-VI: Rindenschichten I bis VI. Grau unterlegt ist im Hauptschema der Gennari-Streifen (Schicht IVB). Entwurf: Alexander Kern

Das Schema zur Verschaltung im Kortex des Primaten (Abb. 4.4-1) bietet einen Überblick möglicher Erregungsflüsse innerhalb der Hirnrinde (in Anlehnung an Szentágothai 1970, 1978, 1979; Nieuwenhuys 1994; Fairén 2007). Es enthält die wichtigsten neokortikalen Zelltypen und deren mögliche Verknüpfungen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind jedoch nur einige repräsentative synaptische Interaktionen dargestellt, obwohl allgemein als gesichert gilt, dass kortikale Neuronen synaptische Eingänge in einer Größenordnung von ungefähr 10.000 besitzen (Tiesinga et al. 2002; Fairén 2007; Tiesinga et al. 2008). In der Abbildung sollen alle intrakortikalen Erregungsflüsse der Einfachheit halber jeweils zeitgleich stattfinden (schwarzer Punkt "time" mit zwei konvergierenden Pfeilen). Übergeordnete Aspekte der Kortexfunktion sind als pinkfarbene umrandete ovale Felder dargestellt. Auf der rechten Seite neben dem Hauptschema befindet sich oben eine kurze Zusammenfassung (Kurzschema) der sechs repräsentativen Typen von Weiterverarbeitung thalamischer Information (Fallnummern 1-6; gelbe Pfeile). Darunter eine Legende zu den *Synapsentypen* (erregende Synapsen als "+" mit grüner Umrandung, hemmende Synapsen als "-" mit roter Umrandung, gestrichelte Darstellung der Synapsen deutet das vorübergehende Erlöschen der jeweiligen Synapsenart an) und *Zellfortsätzen*, sowie ganz unten eine Legende zu den im Schema verwendeten *Zelltypen* (links unten die exzitatorischen Neuronen, rechts unten die inhibitorischen).

Die Informationen zu den einzelnen Kortexschichten und zur Verschaltung der Neuronen basieren, abgesehen von den hier präsentierten eigenen Ergebnissen, auf Daten früherer Publikationen und werden nachfolgend zusammengestellt. Dabei werden Angaben folgender Autoren zu Schicht I (Lorente de Nó 1938; Peters und

Jones 1984; Valverde und Facal-Valverde 1986; White 1989; DeFelipe und Farinas 1992; Kuroda et al. 1993; Nieuwenhuys 1994), zu den Schichten II, III, V und VI (Hornung und Garey 1981; Hendry und Jones 1983; White 1989; Kuroda et al. 1993; Tiesinga et al. 2008) sowie zu Schicht IV (Von Bonin und Bailey 1961; Garey 1971; Hubel und Wiesel 1972; Lund 1973; Lund und Boothe 1975; Braak 1976; White 1978; Barlow 1981; Hersch und White 1981; White und Hersch 1981; Hersch und White 1982; White 1982; Lund 1984; Saint Marie und Peters 1985; Huntley et al. 1994; Nieuwenhuys 1994) übernommen.

Hinsichtlich der Propagation thalamischer Erregungen zeigt **Fallbeispiel 1** die exzitatorische Weiterleitung eines eingehenden erregenden Thalamussignals (Oval "thalamic input") in Schicht IVc $\beta$  mit Hilfe einer bedornten Sternzelle (spiny stellate cell; s. auch Kurzschemata in Abb. 4.4-1 ganz rechts und Legende rechts unten). Diese Zelle schaltet mit ihrem Hauptaxon (blau) exzitatorisch auf eine Pyramidenzelle (Perikaryon) in der unteren Schicht III, die ihrerseits erregend auf eine Pyramidenzelle in Schicht II einwirkt. Über Kollaterale (violett) wird die Erregung zusätzlich exzitatorisch auf andere Neuronen übertragen.

In **Fallbeispiel 2** wird das eingehende erregende Thalamus-Signal in Schicht IVc $\alpha$  in gleicher Weise auf eine bedornte Sternzelle übertragen. Diese Zelle erregt dann ihrerseits eine Doppelbuschzelle (double bouquet cell) in der mittleren Schicht III, die selbst einen hemmenden Einfluss auf eine Pyramidenzelle in der unteren Schicht III ausübt. Diese Pyramidenzelle wird somit inhibiert und kann im gegebenen Moment kein erregendes Aktionspotential mehr ausbilden. Angemerkt sei an dieser Stelle, dass häufig u.a. Pyramidenzellen der unteren Schicht III (sowie Martinotti-Zellen der Schicht VI; in Fallbeispiel 3) assoziative Fasern über Schicht I in andere Kortex-Areale entsenden (rotes Oval "association" in Schicht I). Fallbeispiel 2 erläutert also das Prinzip der Inhibition einer ursprünglich erregenden Zelle (in diesem Fall eine Pyramidenzelle) aufgrund der blockierenden Einwirkung einer inhibitorischen Zelle (in diesem Fall einer Doppelbuschzelle).

In **Fallbeispiel 3** wird gezeigt, wie eine durch den Thalamus in Schicht IVb erregte bedornte Sternzelle ihrerseits eine hemmende Korbzelle (basket cell) in Schicht IVc $\beta$  erregt. Diese Korbzelle blockiert schließlich eine ebenfalls inhibitorische Kandelaberzelle (chandelier cell) in Schicht V. Als Ergebnis wird die Kandelaberzelle gehemmt und ihr ursprünglich hemmender Einfluss auf ein großes Pyramidenneuron in Schicht V entfällt. Das Pyramidenneuron kann nun über diese sogenannte

'Disinhibition' (die Aufhebung der Hemmung) wieder aktiv werden und ein exzitatorisches Aktionspotential bilden. Damit sind wir mit den großen Pyramidenzellen in Schicht V am Ursprungshorizont der meisten kortikofugalen Projektionen ("cortical output") angelangt. Gleichzeitig erregt die große Pyramidenzelle über eine Axonkollaterale eine Martinotti-Zelle in Schicht VI, die ihrerseits einen Teil der assoziativen Fasern für Schicht I beisteuert (rotes Oval "association"). Ergänzend wird in Fallbeispiel 3 gezeigt, wie eine Pyramidenzelle in Schicht V/VI, durch die Axonkollaterale einer bedornten Sternzelle erregt, für die kortikofugale Rückkopplung zum Thalamus sorgt (rotes Oval "feed-back loop").

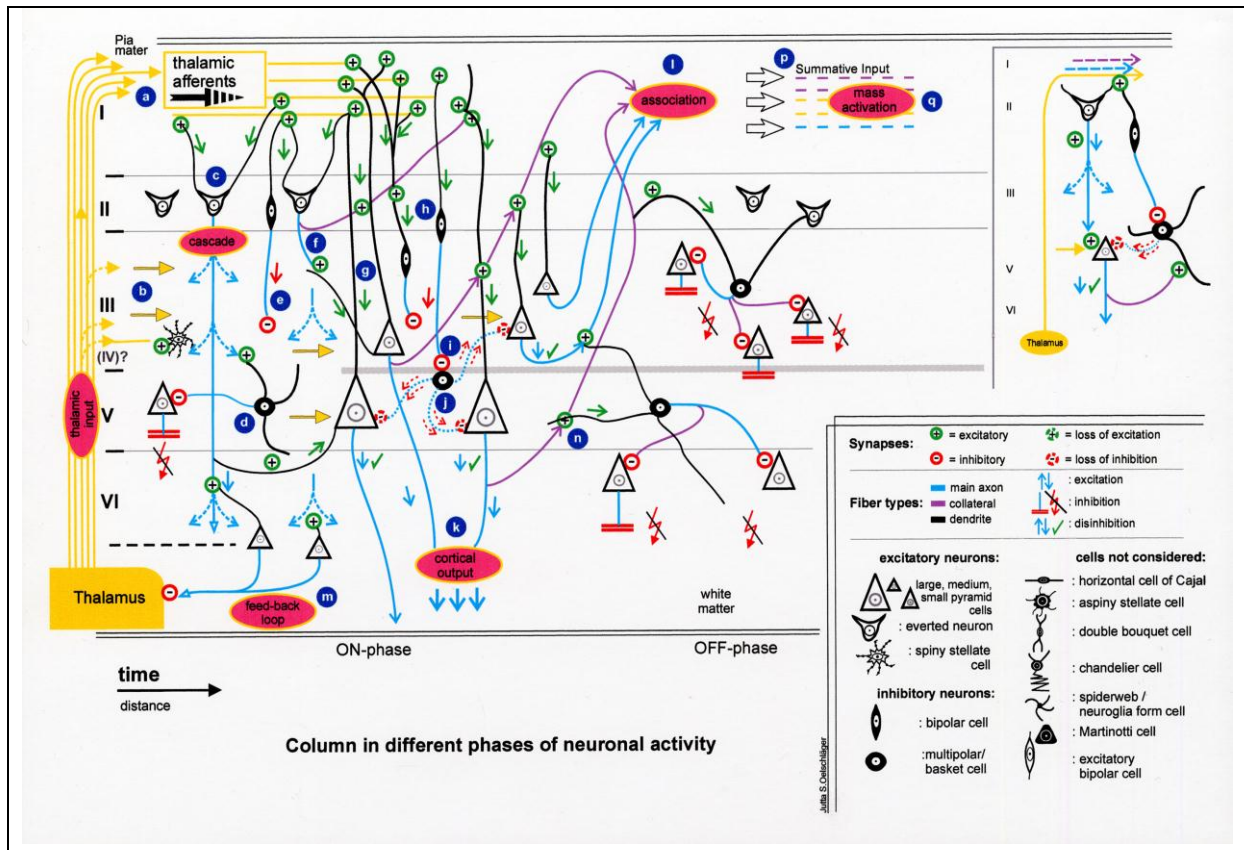
**Fallbeispiel 4** (auf der rechten Seite des Hauptschemas) zeigt ein zunächst erregendes Thalamus-Signal, welches in Schicht IVb auf eine inhibitorische unbedornte Sternzelle trifft (aspiny stellate cell; s. Legende rechts unten). Dieses Neuron hemmt seinerseits eine Pyramidenzelle in der mittleren und ein bipolares Neuron in der unteren Schicht III. Die beiden ursprünglich exzitatorisch aktiven Zellen werden auf diese Weise inhibiert, ihr erregender Einfluss erlischt.

**Fallbeispiel 5** zeigt wiederum, wie die eingehende Thalamus-Information in Schicht IVb auf eine unbedornte Sternzelle übertragen wird. Dieses inhibitorische Neuron hemmt daraufhin jetzt eine Korbzelle an der Grenze zwischen den Schichten III und IV. Durch die Hemmung fällt der blockierende Einfluss dieser Korbzelle auf ein Pyramidenneuron in Schicht IVc weg. Das Pyramidenneuron wird dadurch disinhibiert und kann nun selbst wieder aktiv in Richtung weiße Substanz (white matter) projizieren.

Abschließend soll in **Fallbeispiel 6** die Erweiterung des allgemeinen Erregungsspektrums (der bedornten Sternzellen aus den Fallbeispielen 1-3) durch vorherige Zwischenschaltung eines hemmenden Elements gezeigt werden: durch die Einbeziehung einer inhibitorisch wirkenden, Neuroglia-ähnlichen Zelle (spiderweb/neurogliaform cell) als Rezipienten der thalamischen Projektion (Schicht IVb) wird als scheinbar simples Resultat eine bedornte Sternzelle gehemmt. Diese Hemmung der in den Fallbeispielen 1-3 zuvor charakterisierten (und ihrer zentralen Stellung wegen besonders bedeutenden) bedornten Sternzellen konterkariert alle in den genannten Beispielen 1-3 dargestellten komplizierteren Verschaltungsmöglichkeiten. Die simple Zwischenschaltung eines hemmenden Elements (in diesem Fall einer neurogliaformen Zelle) zeigt die enorme Bandbreite an möglichen kortikalen Neuronenverknüpfungen. Die Summe all dieser Möglichkeiten der Verschaltung

demonstriert eindrucksvoll die enorme Kapazität der Hirnrinde im Hinblick auf eine Feinanalyse von eingehenden Informationen innerhalb des Kortex (rote Ovale "analysis" im Hauptschema, "fine grain modulation" rechts unter b).

Die Endhirnrinde des Primaten besitzt also ein erhebliches Potential im Sinne einer hohen "Auflösung" der Parameter von eingehenden Erregungen, ganz besonders im primär-visuellen Areal (Barlow 1979, 1981).



**Abb 4.4-2: Schema der intrinsischen Kortexverschaltung beim Delphin.**

Analog zu Abb. 4.4-1 zeigt dieses Schema die wichtigsten neokortikalen Zelltypen (rechts unten) und deren mögliche Verknüpfungen nach Rezeption von thalamischem Input (links: "thalamic input") vor allem im zeitlichen Verlauf (schwarzer Pfeil und "time", links unten) sowie untergeordnet auch topographisch gesehen ("distance", links unten). Links befindet sich das Hauptschema, rechts oben ein zusammenfassendes Kurzschema, rechts unten die Legende zur möglichen Synapsenfunktion ("+" mit grüner Umrandung: erregend, "-" mit roter Umrandung: hemmend), den Fasertypen (Hauptaxon: blau, Axonkollaterale: violett, Dendrit: schwarz) sowie den Neuronentypen. Exzitatorische Zellen sind schwarz umrandet, inhibitorische Zellen schwarz ausgefüllt. Gestrichelt dargestellte Synapsen deuten ein vorübergehendes Erlöschen der Synapsenfunktion an. Übergeordnete funktionelle Aspekte sind im Hauptschema als rote Ovale mit gelber Umrandung gekennzeichnet. Weitere Erläuterungen zum Schema finden sich im Text.

I-VI: Rindenschichten I bis VI. Grau unterlegt [und links im Hauptschema als "(IV)?" bezeichnet] der Hinweis auf ein mögliches Relikt von Schicht IV (in Analogie zur Darstellung des Gennari-Streifens im Primatenschema, Abb. 4.4-1). Entwurf: Alexander Kern

Das Kortexschema des Delphins (Abb. 4.4-2) zeigt nun im Vergleich mit der Situation bei Primaten grundsätzliche Unterschiede in der intrinsischen Verschaltung (Kesarev et al. 1977; Morgane et al. 1986a, 1986b; Ferrer und Perera 1988; Glezer und Morgane 1990; Morgane et al. 1990; Revishchin und Garey 1990; Glezer et al. 1992; Nieuwenhuys 1994; Oelschläger und Oelschläger 2002, 2009). Links in der Abbildung befindet sich wieder das Hauptschema, rechts oben ein zusammenfassendes Kurzdiagramm, rechts unten die Legende. Exzitatorische Zellen sind wiederum schwarz umrandet, inhibitorische Zellen schwarz ausgefüllt. Aus Gründen der geringeren Zellvielfalt im Zahnwalkortex fehlen beim Delphin einige Neuronentypen (s. Abb. 4.4.2, "cells not considered", rechts unten in der Legende). Im Unterschied zum Primatenschema (Abb. 4.4-1) zeigt das Delphinschema von links nach rechts den chronologischen Ablauf der Aktivierung neuronaler Verknüpfungen (links unten im Schema, dargestellt durch einen Pfeil mit "time" im Hinblick auf die Beteiligung umliegender Kortexbezirke sowie mit "distance" für die horizontale Propagation neuronaler Impulse). Potentielle Relikte der im Zahnwal-Kortex meist fehlenden Schicht IV sind durch eine schmale graue Bande (Analogie zum Gennari-Streifen bei Primaten) sowie eine repräsentative bedornete Sternzelle (spiny stellate cell) am Übergang von Schicht III zu Schicht V angedeutet ("IV?"). Übergeordnete funktionelle Aspekte sind wiederum als rote Ovale mit gelber Umrandung dargestellt.

Der Hauptanteil des thalamischen Inputs in den Delphin-Kortex (gelbe Pfeile am linken Rand des Hauptschemas, "thalamic input") kommt über ungerichtete, tangential ziehende Fasern in Schicht I zustande (auslaufender Pfeil "thalamic afferents", a). Diese Fasern sind eigentlich generell exzitatorischer Natur (dargestellt durch eine Vielzahl erregender Synapsen in Schicht I). Ein kleiner Anteil thalamischer Fasern tritt darüberhinaus im Schichtkomplex III/V gezielt, also auf bestimmte Kolumnen/Module ausgerichtet, in den Kortex ein (gezeigt als kurze, gelbe Pfeile, b). Die über horizontal verlaufende Thalamus-Axone in Schicht I eingehende Information wird hauptsächlich durch diametral bis in Schicht I aufragende Apikaldendriten von exzitatorischen evertierten Neuronen (everted neurons) aus Schicht II abgegriffen und ins Kortexinnere bis in Schicht VI transferiert, c). Die Axone der evertierten Neuronen dringen dabei streng zentripetal in die Tiefe vor, wobei sie ihre aktivierenden Signale kaskadenartig auf tiefer gelegene Neuronen bzw. Schichten verteilen (s. Hauptschema links: "cascade"). Zu Beginn der Kortexaktivierung



befindet sich ein Großteil der Pyramidenzellen unter dem hemmendem Einfluss großer, weitreichender multipolarer Zellen (linker Rand des Hauptschemas in Schicht V: Korbzelle, basket cell, d). Neben evertierten Neuronen greifen auch inhibitorische bipolare Interneuronen (bipolar cells in Schicht II) die tangential (en passant) vorüberlaufende Thalamus-Erregung in Layer I ab und senden ihrerseits ein hemmendes Signal in die Tiefe des Kortex (roter Pfeil, e). Dabei scheint bedeutsam, dass inhibitorische bipolare Neuronen präferentiell große multipolare (ebenfalls inhibitorische) Neuronen hemmen (s. Kap. 4.3 und Tab. 4.3-3). Durch diese Disinhibition ("disinhibition"; s. Legende), also den Wegfall der Hemmwirkung der großen multipolaren Zellen auf umliegende Pyramidenzellen, wird der Raum für eine lokale Erregungsbildung geschaffen (Wonders und Anderson 2006; Jones 2009).

Die Entstehung einer solchen lokalen "Erregungswolke" ist im mittleren Abschnitt des Hauptschemas dargestellt: der Bereich oberhalb des Begriffs „ON-phase“ (unten, neben der Zeitachse "time") spiegelt dieses Zeitfenster wider.

Nach initialem Thalamus-Input in Schicht I müssen mehrere essentielle Verschaltungsmechanismen zeitgleich zusammentreffen, um die projizierenden Pyramidenzellen vom hemmenden Einfluss der großen inhibitorischen multipolaren Neuronen zu befreien.

- 1) So kann einerseits ein evertiertes Neuron seinen erregenden Einfluss an tiefergelegene Neuronen senden (wie am Beispiel einer Schicht III-Pyramidenzelle gezeigt, f).
- 2) Andererseits können Pyramidenzellen mit Hilfe ihrer langen, in Schicht I aufragenden Apikaldendriten den anregenden Einfluss der tangentialen Thalamusfasern aus Schicht I selbst abgreifen (g).
- 3) Inhibition findet folgendermaßen statt: durch die thalamische Aktivierung der hemmenden bipolaren Interneuronen in Schicht II (h) erfolgt die Blockierung der großen multipolaren Neuronen in der Tiefe des Kortex (i). Diese Blockierung der ihrerseits Pyramidenzellen hemmenden Multipolaren bewirkt in der Summe jedoch eine Enthemmung der vormals inhibierten Pyramidenzellen (Prinzip der "Disinhibition"; s. gestrichelte Ausläufer der großen multipolaren Zelle der "ON-phase", j).

Durch die Koinzidenz der Mechanismen 1-3 wird es den großen Pyramidenzellen in Schicht V (auch in III und VI) möglich, ein exzitatorisches Aktionspotential auszubilden und auszusenden (k).

Über die letztgenannten Mechanismen kortikaler Aktivität (k) kommt es somit zur Entsendung kortikofugaler Erregungen aus Schicht V in andere Regionen (rotes Oval "cortical output"). Dagegen spielen die Pyramidenzellen in Schicht III eine besondere Rolle bei der assoziativen Transmission von Erregungen über Axone bzw. Axonkollateralen, welche sie in Schicht I entsenden (rotes Oval "association", l). Pyramidenneuronen in Schicht VI schließlich sind verantwortlich für einen Großteil der kortikothalamischen Rückkopplung (rotes Oval "feed-back loop", m).

Als Gegenspieler der Disinhibition beenden die Kollateralen der Pyramidenzellen das "momentane" Zeitfenster der pyramidalen Erregung durch die über Axonkollateralen rückläufige, zeitlich minimal versetzte Aktivierung der zuvor gehemmten großen Multipolaren (n). Das pyramidale Erregungs- Zeitfensters verschwindet ("OFF-phase"): Die Pyramidenzellen kehren in den von große Multipolaren dominierten, gehemmten Ursprungszustand zurück.

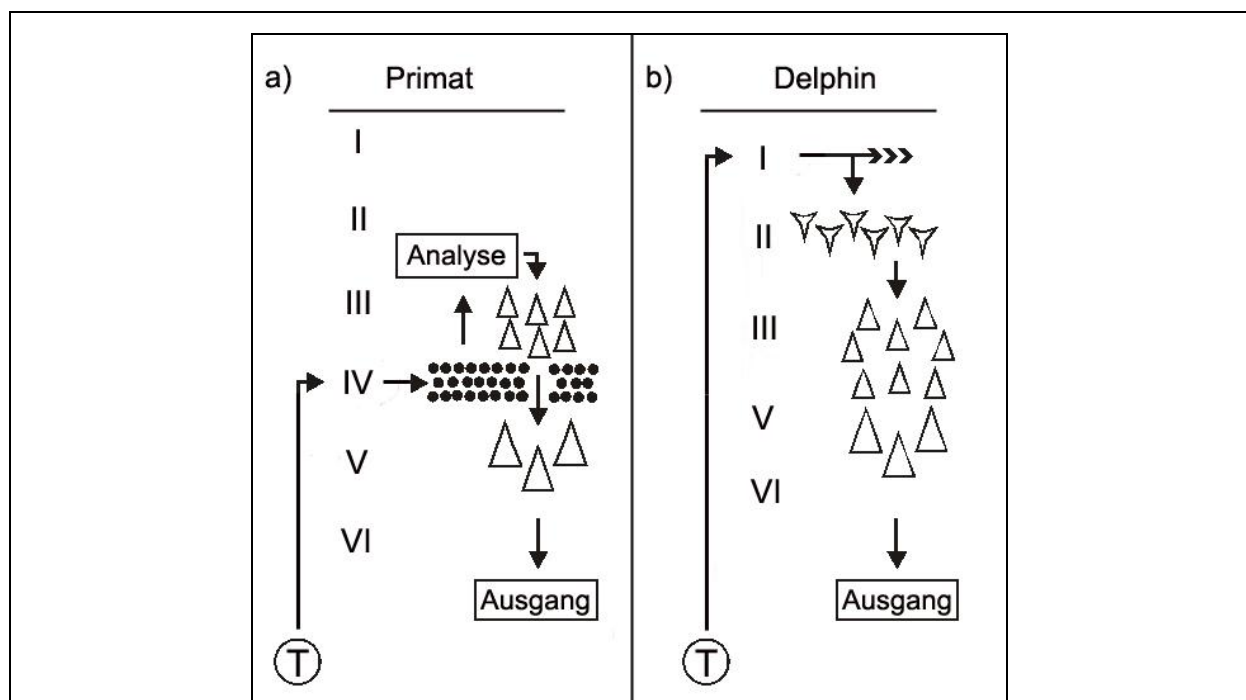
Am Verlauf der Gesamtheit aller ungerichtet-tangential über Schicht I ziehenden erregenden Fasern wird deutlich, dass nicht nur thalamische Fasern, sondern auch assoziative Fasern von kortikalen Pyramidenzellen selbst an der Ausbreitung von Information in umliegende Kortextbereiche verantwortlich sind. Die Qualität der Gesamtheit all dieser Fasern ist im Hauptschema am rechten Oberrand als "summative input" mit unterschiedlichen Faserqualitäten gestrichelt angedeutet (p). Als Ergebnis dieser relativ ungezielten disseminierten Aktivierung umliegender Kortextbezirke stünde eine Massenerregung ganzer Kolumnenverbände (rotes Oval "mass activation", q), sofern zeitgleich über interneuronale Disinhibition für einen Augenblick lokal die Möglichkeit zur pyramidalen Aktivierung ("Erregungswolke") geschaffen würde (vgl. Schritte f- j).

Unter Einbeziehung aller morphologischen und (soweit bekannt) physiologischen Charakteristika sowie durch den Vergleich mit den Verhältnissen bei Primaten lässt der Kortext des Delphins eine eher summarische Art von neuronaler Verrechnung vermuten. Der im Kortext von Primaten (u.a. Mensch, Gorilla, Makak) auf mannigfaltigen neuronalen Schleifen beruhenden, mittelbar-aufsteigenden, intrinsischen Feinanalyse scheint beim Delphin also eine eher unmittelbar-absteigende, massenaktivierende Grobanalyse zu entsprechen, und dies möglicherweise im Sinne einer vergleichsweise groben Reizantwort.

Anders gesagt, scheint der quasi eher kontemplativen, hochanalytischen Verarbeitung der eingehenden Information im Primatenkortext vermutlich eine

schnelle, eher reflexartige Prozessierung neuronaler Signale im Delphinkortex gegenüberzustehen. Hinweise dafür gibt es in der Literatur zum Walgehirn (Ridgway und Brownson 1984; Ridgway 2000); sie beziehen sich auf Charakteristika, welche u.a. als unmittelbare Anpassungen an die physikalischen Parameter des Mediums Wasser als Lebensraum verstanden werden können (Schalleitungsgeschwindigkeit ca. 1500 m/s, kurze Laufzeiten des Sonar-Impulses als Detektionsmittel bei der Unterwasser-Jagd erfordern kurze Reaktionszeiten im Gehirn und demzufolge mutmaßlich hohe Leitungsgeschwindigkeiten in vergleichsweise dicken Axonen).

Zum leichteren Verständnis der oben dargestellten morphologisch-funktionellen Zusammenhänge sind die beiden Abbildungen 4.4-1 und 4.4-2 als stark simplifizierte Schemata in Abbildung 4.4-3 angefügt. Hierbei handelt es sich quasi um die Essenz des Vergleichs der Kortexes unserer beiden Modellsäugetiere, des Primaten und des Delphins.



**Abb. 4.4-3: Vereinfachtes Schema der Kortexverschaltung beim Primaten (a) und beim Delphin (b).**

a) Im sechsschichtigen Koniokortex des *Primaten* projiziert der Thalamus (T) die ankommende Erregung/Information zunächst gezielt auf die innere Körnerzellschicht IV (Eingang). Die Information wird dann durch Körnerzellen (u.a. bedornete Sternzellen, schwarz ausgefüllte Kreise) aufsteigend in die supragranulären Schichten II und III weitergegeben und dort aufwendig verrechnet ("Analyse"). Der kortikale Ausgang besteht aus zentrifugal projizierenden Pyramidenzellen (Dreiecke) vornehmlich der Schichten III und V.

b) Im fünfschichtigen Pyramidenkortex des *Delphins* verläuft die eingehende Information aus dem Thalamus zunächst tangential in Schicht I (gezeigt als fortlaufender Pfeil), wird dann von extravertierten Neuronen der Schicht II (umgedrehte Dreiecke) abgegriffen und

absteigend in den Schichtkomplex III/V transferiert. Der kortikale Ausgang besteht aus zentrifugal projizierenden Pyramidenzellen der Schichten III und V.  
I-VI: Kortexschichten I bis VI.

Insgesamt wird hier deutlich, dass die Hirnrinde bei *Primaten* eine umfangreiche intrakortikale Feinanalyse der eingehenden Information betreibt, bevor sie diese nach intensiver intrinsischer Verarbeitung wieder entlässt. Die Komplexität dieser Hirnrinde korreliert wahrscheinlich direkt mit der enormen Rechenleistung, welche innerhalb des Kortex v.a. für die visuelle Information stattfindet. Charakteristisch ist die aufwendige, hochpräzise Feinanalyse auf granulärer Basis (Koniokortex, deutliche Schicht IV vollgepackt mit kleinen Körnerzellen): dabei werden die ursprünglich thalamischen Erregungen von den mittleren Schichten (v.a. L IV) des Kortex (Eingang) vor dem Verlassen desselben (Schichten LV, LVI; Ausgang) zur weiteren Verrechnung (Analyse) vor allem auf-, aber auch absteigend in die Neuronennetzwerke umliegender Schichten eingespeist.

Bei *Delphinen* zeigt sich dagegen, dass ihr Kortex (anders als der von Primaten) eher im Dienste der relativ groben Massenaktivierung von agranulären Neuronen steht (Pyramidenzellen; Körnerzellschicht IV fehlt!). Vornehmlich tangential über Schicht I eingehende Signale durchlaufen den Kortex vor ihrer Entsendung in andere Gebiete (Kortex und subkortikale Kerngebiete) also eher zügig und unidirektional von der Oberfläche her kommend bis in die tieferen Schichten am Ausgang des Kortex.

Dabei ist zu vermuten, dass den evertierten Neuronen des Delphin-Kortex bei der Aufnahme des thalamischen Inputs in die Hirnrinde bzw. dessen Weitergabe wahrscheinlich eine analoge Rolle zukommt wie den bedornten Sternzellen des Primaten-Kortex. Beiden Typen von exzitatorischen Neuronen wird im Hinblick auf ihre morphologische Entwicklung eine parallele Entstehung aus den gleichen Vorläuferzellen nachgesagt („pyramidales Kontinuum“; Fairén et al. 1984; Nieuwenhuys 1994; Smith und Populin 2001; vgl. Kap. 4.3 und Abb. 4.3-2).

Sowohl die Morphologie als auch die Funktionsweise des Delphinkortex sind sehr wahrscheinlich Ausdruck spezifischer Anpassungen der Tiere an die physikalischen Bedingungen im aquatischen Milieu (Sonar: im Hinblick auf die Geschwindigkeit und das Reflektionsverhalten von Schall sowie die akustische Impedanz in Wasser und in Geweben) und an daraus resultierende neurobiologische Konsequenzen bei der Nutzung/Verarbeitung dieser Modalität. Somit scheinen diese Rahmenbedingungen

in der Kortex-Architektur und -funktion eine unmittelbare und schnelle Verarbeitung von Information in der Vertikalen zu begünstigen.

Vergleicht man das visuelle und das auditorische System hinsichtlich der Qualität ihrer physikalischen Stimuli miteinander, so stößt man bei den beiden Sinnesmodalitäten auf folgende bemerkenswerte Unterschiede: im Gegensatz zur Modalität Licht, welche von der Sonne quasi kontinuierlich "frei Haus" geliefert wird, kommt im Falle des Sonarsystems von Säugetieren die aufwendige Produktion des Schalls, vor allem aber dessen zeitlich präzise Emission bzw. Perzeption in bestimmten Zeitfenstern hinzu (Echoortung und Kommunikation). Speziell bei der Echoortung müssen die hochfrequenten akustischen Stimuli daher vergleichsweise "kurzlebig" sein. Auf kortikalem Niveau könnte das Prinzip der „ON-OFF“- Aktivität (schneller Wechsel von Exzitation/Disinhibition bzw. Inhibition; s. Abb. 4.3-2) diese Form von Kurzlebigkeit garantieren.

Solche durch Afferenzen bedingte Änderungen im auditorischen System sind prinzipiell zeitlich dicht gestaffelt und dürften (im Falle von Delphinschulen mit vielen Mitgliedern) in der neuronalen Verarbeitung sehr aufwendig sein. Im Falle des Biosonars gewinnen akustische Stimuli ihre Bedeutung v.a. über ihre Repetition und den Abgleich zwischen Emission und Perzeption (Schall und Echo). Zumindest bei Säugetieren mit Biosonar sollte daher der Kortex nach der Verarbeitung eines akustischen Signals möglichst schnell wieder in seinen neuronalen Ausgangszustand zurückkehren können, um stets aufs Neue die innerhalb der Gruppe ausgetauschten mannigfaltigen Signale und die bei der Jagd eingesetzten ephemeren Clicks diskriminieren und räumlich und zeitlich adäquat analysieren zu können. [Dies wird verständlich angesichts einer Schall-Leitung in Wasser von ca. 1500 m/sec und der unablässigen Bewegung sowohl des Senders als auch des Empfängers bzw. der Beute (moving target)]. Eine solche Datenfülle dürfte eine enorme zusätzliche Rechenkapazität bzw. Rechengeschwindigkeit erfordern (Ridgway und Brownson 1984).

Für eine solche Funktion des auditorischen Kortex bei Delphinen spricht auch, dass bei den hier bearbeiteten landlebenden Säugern (Hund, Schaf, Schwein, Gorilla und Mensch) im mehr oder weniger deutlich ausgeprägten Regentropfenmuster (raindrop pattern) des primär-akustischen Areals A1 die Betonung der vertikalen Verarbeitung auf den bestimmenden Faktor Zeit im auditorischen System hinweist: gleichzeitig ist seine Schicht IV keinesfalls so markant wie im primär-visuellen Areal V1. Offenbar ist

bei allen Säugetieren die akustische Modalität mit einer arealtypischen Kortex-Architektur korreliert, welche sich durch eine geringere Konvokortikalität (weniger Körnerzellen vor allem in Schicht IV) auszeichnet. Demzufolge kann dieses Regentropfenmuster wahrscheinlich artenübergreifend als ein kortikales 'Leitmotiv' der auditorischen Modalität gelten.

In diesem Zusammenhang spielt möglicherweise auch die allgemein stark ausgeprägte subkortikale Vorverarbeitung von Information innerhalb der Hörbahn eine entscheidende Rolle (Binauralität, Rauschunterdrückung, vgl. Smith und Populin 2001; Oelschläger et al. 2010; Kern et al. 2011; s.o.). Dies steht im klaren Gegensatz zum visuellen System, in welchem weitreichende Feinanalysen des optischen Inputs beider Augen und seine stereoskopische Integration erst innerhalb des Kortex stattfinden (Hubel und Wiesel 1962, 1968, 1972; Lund und Boothe 1975; Lund et al. 1979; Gilbert und Wiesel 1983; White 1989; Smith und Populin 2001).

Auch bei den insektenfressenden Fledermäusen (Microchiroptera), welche mit Hilfe ihres Biosonars jagen, ist im auditorischen Areal die Schicht IV relativ undeutlich, verglichen mit dem visuellen Areal (V1) und seinem ausgeprägten Körnerzellvorkommen in Schicht IV bei diesen Tieren (Fitzpatrick und Henson 1994). Allerdings sind diese Fledermäuse hierin nicht so extrem spezialisiert wie die Zahnwale, da bei ihnen in Schicht IV von A1 die Granularität nicht gänzlich fehlt. Somit dominieren in der auditorischen Rinde offenbar generell pyramidale über granuläre Zellformen, wie dies u.a. für die Säuger Katze (Smith und Populin 2001), Fledermaus (Ferrer 1987; Fitzpatrick und Henson 1994), Makak (Glezer et al. 1998) und Mensch (Meyer et al. 1989) im direkten Vergleich der beiden Kortizes (A1, V1) gezeigt wurde. Allerdings scheinen die Zahnwale nicht nur über alle hier vorgestellten primären Areale (M1-V1) hinweg, sondern auch in den übrigen neokortikalen Regionen quasi "auditorisch überprägt" zu sein, was die histologische Analyse der Hirnrinde erschwert. Nur die landlebenden Fledermäuse mit ihrem Biosonar, und sog. "basale Insektivoren" (Insektenfresser), wie z.B. der Igel, besitzen einen in ähnlicher Weise arealübergreifend im Ansatz "auditorisch" konfigurierten Kortex (Valverde und López-Mascaraque 1981; Valverde 1983, 1986; Valverde et al. 1986; Valverde und Facal-Valverde 1986; Ferrer 1987; Fitzpatrick und Henson 1994; Valverde et al. 2002). [Insektenfresser sind meist nachtaktiv und zumindest manche Arten können Ultraschall erzeugen und perzipieren und sich vermutlich damit orientieren (Krapp und Niethammer 1990). Bei ihnen dominiert sinnesphysiologisch das olfaktorische System (Paläokortex), während der



Neokortex auf dem Scheitel der Endhirn-Hemisphäre ein kleines Areal einnimmt.] Dennoch findet sich bei terrestrischen Säugetieren- im markanten Unterschied zu den Zahnwalen- in primär-rezeptiven Arealen (v.a. visuelle, aber auch auditorische Rinde) stets die Schicht IV als das Kriterium für echte Granularität.

Die erstaunliche Vergrößerung der Neokortex-Oberfläche (und damit auch des Hirnvolumens) bei Zahnwalen (v.a. bei Hochsee-Delphinen) kann möglicherweise als eine Art von großflächiger Kompensation für den Verlust oder die Beschränkung von Sinnessystemen (Riechsinn, Gleichgewichtssinn) verstanden werden (Oelschläger 2008; Kern et al. 2009). Die daraus resultierende sehr große Zahl kortikaler Kolumnen dürfte für die Analyse eines auch für Säugetiere extrem dichten, ökophysiologisch bedingten und vorwiegend auditorischen Inputs verstanden werden. Für massenhafte, ultraschnelle, wenn vielleicht auch vergleichsweise simple Analysen (möglichweise u.a. zur Topologie und Geschwindigkeit von Artgenossen und Beutetieren im Raum; Dopplerprinzip) scheinen hierbei pyramidal-geprägte kortikale Kolumnen besonders geeignet. Dies könnte auch damit zusammenhängen, dass die verarbeitete Information entsprechend der stetigen Veränderung der Umwelt eines Delphins im freien Ozean vergleichsweise kurzlebig ist und schon bald neuen Koordinaten Platz machen muss. Konstanten in diesem Geschehen könnten bis zu einem gewissen Grad repetitive Lautmuster von eigenen Artgenossen sein, welche in größeren Schulen von sozial lebenden Delphinen gegen ein ausgeprägtes "Hintergrundrauschen" anderer Signale (Clicks und Kommunikationslaute) von fremden Artgenossen detektiert und fokussiert werden müssen.

Die für Zahnwale typische geringe Dicke der Hirnrinde, der vergleichsweise niedrige Anteil des kortikalen Griseum (graue Substanz) am Gesamthirn (Glezer et al. 1988; Manger 2006; Oelschläger et al. 2010) und die vergleichsweise niedrige Neuronendichte bzw. die damit korrelierende große Menge an Gliazellen (hoher Glia-Neuron-Index; Oelschläger und Oelschläger 2009) können überdies noch mit einem weiteren wichtigen physiologischen Aspekt in Verbindung gebracht werden: Bei langen Tauchgängen droht die Gefahr einer Neuronen-Schädigung durch zerebrale Hypoxie und daraus resultierende pH-Verschiebungen. Der Gefahr solcher metabolischer Alterationen können die Tiere letztlich jederzeit ausgesetzt sein, so etwa bei der Verfolgung durch Fressfeinde (bzw. heute auch infolge der Einwirkung des Menschen) und eine damit verbundene Überschreitung der physiologischen Tauchzeit bzw. Tauchtiefe. Daher scheint eine hohe Dichte an metabolisch-protectiv

einwirkenden Gliazellen zur Stabilisierung der Membranen bei einer latenten Hypoxie sinnvoll. Eine eher geringe Zahl vergleichsweise großer Neuronen (s. Pakkenberg und Gundersen 1997; Manger 2006; Oelschläger und Oelschläger 2009; Poth et al., unpubliziert) sollte zu einer relativen Abnahme der Neuronenoberfläche insgesamt führen und die Gewährleistung der elektrischen Homöostase im Zellinneren erleichtern. Durch all die oben genannten neurobiologischen Zusammenhänge wird die eigentümliche Bauweise des Zahnwalkortex besser verständlich (Pritz-Hohmeier et al. 1994; Hilgetag und Barbas 2009). Hierher gehört auch die potentiell modulatorische Rolle der Glia bei der Transmission von Information über die Massenaktivierung von Neuronenverbänden, einem mutmaßlich grundlegenden Prinzip in der Aktivität der Hirnrinde von Delphinen (Fields 2005; Deitmer und Steinhäuser 2010).

#### **4.5 Die Kortex-Morphologie und - Funktion bei Säugetieren: Fazit und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit klassischen und modernen morphologischen Methoden den Neokortex der Säugetiere zu analysieren. Dabei wurden vor allem drei Aspekte berücksichtigt: erstens die Frage nach Zusammenhängen zwischen Hirngröße, Kortexmasse und Kortexgliederung, zweitens die Beschreibung von Abwandlungen der Kortexstrukturen in unterschiedlichen Gruppen von Säugetieren, wobei sich grundlegende Unterschiede zwischen landlebenden Säugetieren und den wasserlebenden Zahnwalen ergaben. Drittens wurden an zwei extrem gegensätzlichen Kortices (Primaten, Delphine) die zugrundeliegenden morphologisch-funktionellen Trends erarbeitet und mit evolutionsbiologischen Aussagen korreliert. Vor allem bei den Delphinen ist (vor dem Hintergrund der mit ihnen verglichenen terrestrischen Säugetiere) eine offenbar strenge Gesetzmäßigkeit zwischen dem Lebensraum der Gruppe bzw. einer Spezies und ihrem Kortexbau zu beobachten. Letzten Endes sind es wohl vor allem die physikalischen Parameter, welche die Rahmenbedingungen für die Existenz einer Spezies in ihrem jeweiligen Lebensraum schaffen. Dramatische Lebensraumwechsel wie im Falle der Zahnwale (Delphine) sind daher mit vergleichsweise starken morphologisch-funktionellen Veränderungen in sämtlichen Strukturen des Körpers, aber auch des Gehirns zu beobachten. Dabei kommt der Analyse zugute, dass das Gehirn die Körperperipherie und damit auch die Kapazität der Sinnesorgane eines Individuums in seiner ökologischen Nische widerspiegelt, so dass evolutionäre

Anpassungen an der Struktur des Gehirns abgelesen werden können. Die Delphine sind in ihrer Hirnstruktur extrem modifiziert: Die in der vorliegenden Schrift bearbeiteten primären neokortikalen Hirnareale wurden während der Evolution entsprechend den (gemessen an anderen Säugetieren) limitierten sensorischen Möglichkeiten und dem Zwang zur Kompensation verlorengangener oder reduzierter Sinne, durch das auditorische System stark überprägt - dem einzigen hier wirklich verlässlichen und daher extrem erfolgreichen Sinnessystem. Zahnwale können sich mit ihrem hochentwickelten Sonar auch bei Dunkelheit perfekt orientieren, effizient jagen und aufwendig miteinander kommunizieren. Sie sind allerdings bei aller Perfektion sinnesphysiologisch gesehen Spezialisten (Oelschläger 2008, Kern et al. 2009, Kern et al. 2011), während Primaten und damit auch der Mensch als mehr oder minder ausgeprägte Generalisten gelten müssen. Die gute Übereinstimmung in der Hirnmasse-Körpermasse-Beziehung bei Hochsee-Delphinen und Menschen ist somit vermutlich irreführend, denn die Zahl der Sinnessysteme und ihre jeweilige Leistungskraft entscheidet über die multisensorische, d.h. die integrative Kapazität eines Gehirns- also über die Möglichkeiten, die eigene Umwelt zu analysieren und zu nutzen. So gesehen ist der Mensch ein Universalist auf höchstem Niveau (alle Sinne vorhanden und gut bis sehr gut entwickelt), während der Delphin in seinen sinnesphysiologischen Beschränkungen und durch die Notwendigkeit, große Mengen akustischer Information zu verarbeiten, qualitativ gesehen die Maximalvariante eines Spezialisten darstellt.

Bei der Detailbetrachtung des Gehirns wird offensichtlich, dass die topographische Abfolge der primären neokortikalen Projektionsareale bei Säugetieren von frontal nach okzipital prinzipiell übereinstimmt (Nieuwenhuys 1998). Allerdings ergibt sich durch die Neubildung von assoziativen bzw. integrativen (multisensorischen) und damit übergeordneten Arealen eine deutliche bis extreme Abwandlung dieser Anordnung:

Jedes Primärareal hat, bezogen auf das menschliche Gehirn als Maximalvariante innerhalb der Primaten, seinen Sitz in einem eigenen Großhirnlappen: die Motorik hat ihren Sitz im Frontallappen, die Somatosensibilität im Parietallappen, das auditorische System im Temporallappen und das visuelle System im Okzipitallappen (Nieuwenhuys 1998; s. Abb. 1.5-2). Die meisten Areale, insbesondere die drei sensorisch-rezeptiven Areale S1, A1 und V1, besitzen also topographisch gesehen

einen sehr deutlichen Abstand voneinander (Ausnahme M1 zu S1; s.u.). Möglicherweise kam diese Distanz durch eine ontogenetische Proliferation der beteiligten Areale durch strukturelle, zentrifugale Randerweiterungen zustande. Die aneinander kontaktierenden Ränder könnten sich in der Folge zu synthetisch organisierten Rindengebieten entwickelt haben. Solche Arealerweiterungen dienen höheren (also nicht mehr primären) Rindenfunktionen. Auf diese Weise wird eine gegenseitige Durchdringung und damit die Interaktion der verschiedenen Systeme in diesen "neuen" Regionen im Sinne von multisensorischen bzw. multifunktionalen, also assoziativen Arealen möglich. Diese neue Lösung (bisher für Hominiden mit "Neo-Neokortex" beschrieben; Eccles 1989; s. Kap. 1.1) war wohl nur ab einer bestimmten Hirngröße möglich oder notwendig, was neben den Primaten auch für Elefanten sowie Zahnwale zutrifft (s. Kap. 1.2) und damit weitere Fragen aufwirft.

So z.B. nach der Identität des großen lateralen Rindengebietes im Zentrum der Hemisphäre bei Zahnwalen, welches bislang bei elektrophysiologischen Rindenableitungen keiner bestimmten Sinnesqualität zugeordnet werden konnte (Kesarev und Malofeyeva 1969; Sokolov et al. 1972; Ladygina und Supin 1977; Ladygina et al. 1978; Popov et al. 1986). Möglicherweise sind solche Regionen in gewisser Hinsicht den sogenannten "stummen Kortexzonen" (silent cortex) des Menschen vergleichbar, bei denen eine oberflächliche elektrische Reizung des Kortex kein direkt zuordnungsfähiges Ergebnis (Reizantwort) in Form einer primären Sinnesqualität (Sehen, Hören, Fühlen, Riechen, Schmecken) erbringt (Penfield 1964, 1975, u.a).

Das Prinzip des deutlichen Zwischenraums bei primären Kortexen gilt offensichtlich nicht für die Areale M1 und S1, welche am Sulcus centralis fast unmittelbar aneinanderstoßen. Ihre enge Nachbarschaft muss daher mit einer Zusatzhypothese erklärt werden. Möglicherweise ist die funktionell-phylogenetische Beziehung zwischen diesen beiden Regionen so eng ("Schicksalsgemeinschaft"), dass ihre Topographie auch durch die Laufzeiten der zwischen ihnen vermittelnden Erregungen mitbestimmt wird. Damit sind diese beiden Areale M1/S1 im Gegensatz zu den anderen primären Arealen zwar durch den Sulcus centralis (oberflächlich) überdeutlich voneinander getrennt, doch ist diese Trennung nur scheinbar, da die beiden Kortexqualitäten in der Tiefe des Sulcus unmittelbar zusammenhängen und dort strukturell ineinander übergehen ("M1-S1-Reflexbogen").

Ausgehend von dem Phänomen der “stummen Kortextzonen“ erhebt sich die Frage, welche besonderen Funktionen und Funktionsweisen sich in diesen neo-neokortikalen Arealen zwischen und um die Primärfelder herum verbergen mögen. Auch wäre interessant zu wissen, ob sich für Hirnrindenregionen wie den präfrontalen Kortex (PFC) im Stirnlappen des Menschen [diese Region wird u.a. als morphologisches Substrat für Persönlichkeit, Charakter, Individualität, soziales Miteinander und moralische Empfindung betrachtet; Linden 2007] auch bei anderen Säugetieren morphologisch-funktionelle Korrelate finden lassen. Dies gilt vor allem für Delphine mit einer großen Fläche von mutmaßlichem stummem Kortex, zumindest was bisherige Untersuchungen hierzu zeigen (Ladygina und Supin 1977 u.a.). Neuerdings wurde auch Rabenvögeln ein dem präfrontalen Kortex entsprechendes Hirnareal zugeschrieben (vgl. Güntürkün 2005; Herold et al. 2011). Inwieweit diese miteinander verglichenen Hirngebiete, soweit sie wissenschaftlichen Untersuchungen überhaupt methodisch und intellektuell zugänglich sind, auch für vergleichbare neurobiologische Leistungen stehen, ist bislang nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Analyse der vier primären Rindenareale als ein Eckpfeiler für die weitere Untersuchung der Struktur und Funktion der Großhirnrinde bei Säugetieren verstanden. Ausgehend von diesen „Landmarken“ sollte sich bei systematisch und ökophysiologisch unterschiedlichen Säugetieren ein ganzes Spektrum von kortikalen Mischformen finden lassen.

Für weitere Analysen drängt sich daher die Frage auf, wie die sowohl topographisch als auch funktionell zwischen- bzw. nachgeschalteten, nicht-primären und deshalb auch als „hierarchisch höher“ einzustufenden Rindenareale im Detail beschaffen sein mögen. Das Studium dieser übergeordneten Areale dürfte unser Verständnis von der Funktion des Gehirns ein großes Stück weiterbringen.

Die vorliegende Arbeit versteht sich als einen bescheidenen Beitrag auf diesem Wege der Erkenntnis.

## 5 Zusammenfassung

In der Neurobiologie nimmt die Untersuchung der Großhirnrinde (Neokortex) eine gewisse Sonderstellung ein, weil das Verständnis dieser hierarchisch übergeordneten Region für die Analyse bzw. Rekonstruktion der Hirnfunktionen insgesamt von entscheidender Bedeutung ist.

Dabei macht Folgendes die bedeutungsvolle Stellung des Neokortex aus: seine späte stammesgeschichtliche und ontogenetische Entwicklung, welche bei mehreren Säugetiergruppen mit einer ungewöhnlichen Massenzunahme und Plastizität verbunden ist und letzten Endes auch Raum für Individualität und Intelligenz schafft. Dabei kommt es speziell bei Primaten inklusive des Menschen zu einer zunehmenden Diversifizierung in Areale, welche primär den Sinnessystemen (Sehen, Hören, Tastsinn) sowie der Motorik zugeordnet sind. Mit steigender "Evolutionshöhe" der Säugetiere treten aber auch hierarchisch übergeordnete sekundäre, tertiäre und weitere Areale auf, welche zunehmend der Assoziation bzw. Integration von Sinnessystemen gewidmet sind. All diese Areale steuern die Interaktion des Individuums mit seiner Umwelt, d.h. sie formulieren anhand des aus der Peripherie eingehenden afferenten Inputs eine biologisch sinnvolle (motorische) Reiz-Antwort und ermöglichen in ihrer Gesamtheit (vor allem beim Menschen) auch kognitive Prozesse, so z.B. multisensorisches und assoziatives Denken, aber auch Antrieb, Planung, Erinnerung und ein hochkompliziertes Sozialverhalten.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit besteht darin, bei verschiedenen, teilweise extrem unterschiedlichen Säugetiergruppen über die vergleichende Morphologie der primären Neokortex-Areale zu einem besseren Verständnis grundsätzlicher neokortikaler Funktionsprinzipien (Input, intrinsische Verschaltung, Output) beizutragen. Die Einbeziehung phylogenetischer Aspekte kann dabei helfen, die kortikalen Spezifika der jeweiligen Säugetiere auf ihren Anpassungswert hin kritisch zu überprüfen.

Im Detail werden die vier primären Rindenfelder des auditorischen [A1], motorischen [M1], somatosensiblen [S1] und visuellen Systems [V1] bei Spezies aus unterschiedlichen Ordnungen wie den Primaten (Mensch, Gorilla), Raubtieren (Hund), Paarhufer (Artiodactyla: Schwein, Schaf) sowie der Wale und Delphine (Zahnwale oder Odontoceti; u.a. Großer Tümmler, Schweinswal) anhand einer ganzen Palette von qualitativen und quantitativen Methoden konsequent miteinander



verglichen. Als eine solide Basis dient hier die allgemeine Zytoarchitektur (Nissl- und teilweise Golgi-Färbung), welche durch immunhistochemische Marker (Calbindin, Calretinin, Parvalbumin und Neurofilament) um eine funktionell-neurobiologische Ebene erweitert wird. Die neben den Primaten im Fokus stehenden Delphine, welche sich durch eine erstaunliche Uniformität ihrer Großhirnrinde auszeichnen, werden mittels der "design-basierten" Stereologie zusätzlich auf die Neuronendichte der kortikalen Areale bzw. ihrer Rindenschichten hin untersucht. Dabei wurden anhand phylogenetischer und evolutionsbiologischer Überlegungen jeweils die Rindenschichten III-V als "Schlüsselregion" ausgewählt, um über die Berechnung von Neuronendichten innerhalb dieser Schichten III und V mehr über die funktionellen Implikationen dieses eigentümlichen Neokortex herauszufinden.

Insgesamt zeigt sich, dass der Neokortex im Laufe der Evolution wohl gerade bei den landlebenden Primaten besonders stark diversifiziert worden ist: ihre vier primären Rindenfelder unterscheiden sich im Vergleich mit anderen Säugetieren besonders deutlich: hinsichtlich der Rindengliederung, der Ausstattung mit Neuronentypen sowie der intrinsischen Verschaltung erreicht dieser Kortex ein Höchstmaß an Komplexität. Besonders deutlich wird dies in den granulären Arealen, welche besonders viele Körnerzellen aufweisen (vor allem in der inneren Körnerzellschicht, Lamina IV).

Demgegenüber finden sich bei den holoaquatischen Delphinen stark abweichende Verhältnisse. Ihre Großhirnrinde erscheint nicht nur allgemein recht einheitlich bzw. monoton, sondern auch in ihrer intrinsischen Funktionsweise stark abgeleitet: hier zeigt sich ein genereller Trend zur Entwicklung einer uniformen Rinde auf gänzlich pyramidal-agranulärer Basis, welche durch das Fehlen einer deutlich erkennbaren Schicht IV gekennzeichnet ist.

Bei einem Vergleich der bearbeiteten Säugetiergruppen ergibt sich ein neokortikales Kontinuum zwischen der granulären und der pyramidalen Bauweise zweier herausgehobener "Modellsäuger", welche einander gewissermaßen als morphologische und funktionelle Extreme gegenüberstehen: mit den Primaten als dem einen (granulären) Endpunkt und den Delphinen als dem anderen (pyramidalen) Endpunkt sowie dazwischen vermittelnden Übergangsformen.

Die Hirnrinde des terrestrischen Karnivoren (Hund) zeigt dabei zuweilen Charakteristika, welche ihn eher in die Nähe der Primaten rücken. Bei den

terrestrischen Paarhufern (Schaf, Schwein) finden sich dagegen manche Kortex-Merkmale, welche an die Situation bei Delphinen erinnern.

Von besonderer Bedeutung ist hier nun die Feststellung, dass wohl gerade die sekundäre Anpassung der Zahnwale (Delphine) an eine ausschließlich aquatische Lebensweise für die Ausbildung ihres ureigenen Typus von Kortex entscheidend gewesen sein dürfte. In diesem Zusammenhang werden die physikalischen Eigenschaften von Wasser die Rahmenbedingungen für evolutionäre Abwandlungen innerhalb des Gehirns als Ganzem vorgegeben haben. Interessanterweise werden neben den höchst-enzephalisierten Vertretern unter den Primaten (Hominidae; Mensch und Menschenaffen) auch den Zahnwalen (Delphinen) von manchen Neurobiologen herausragende kognitive und intellektuelle Fähigkeiten zugeschrieben - trotz der diametral unterschiedlichen Organisation ihres Kortex. Ob und inwieweit dies zutrifft, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verlangen für die Zukunft nach weiteren gleichartigen Untersuchungen der nicht-primären, also hierarchisch übergeordneten neokortikalen Assoziationsareale im Hinblick auf funktionelle und evolutionsbiologische Implikationen.

Die überwältigende Expansion des Neokortex und die daran gekoppelte starke Zunahme der neurobiologischen Kapazität des Gehirns insgesamt dürfte nicht nur bei den Primaten, sondern (in bescheidenerem Umfang) auch bei Delphinen zur Entstehung von kortikalen "Freiräumen" geführt haben. Beim Menschen handelt es sich bei diesem Zuwachs an Hirnmasse und Hirnkapazität vermutlich um das Substrat für die Entstehung der phylogenetisch jüngsten und kognitiv höchstabgeleiteten Merkmale, nämlich Sprache, Persönlichkeit und Vernunft.

## 6 Summary

In the field of neurobiology, the investigation of the neocortex holds an exceptional position because the understanding of this superordinate region has crucial importance for the analysis and reconstruction of brain function, in general.

In view of the following, the biological significance of the neocortex becomes clear: its late ontogenetic and phylogenetic development, linked to particular mass increase and plasticity in many mammalian species, makes way for individuality and intelligence. Particularly in primates including the human, an increasing diversification takes place in areas primarily dedicated to sensory systems (e.g. vision, hearing, sense of touch,) as well as motor function. In addition, hierarchical superordinated “higher” areas (like secondary, tertiary etc. neocortical fields) have developed in parallel with a continuing ascent of mammals on the evolutionary scale. These higher areas are increasingly devoted to associative and integrative tasks; they seem to manage the individual’s interaction with its environment, i.e. on the basis of afferent input coming in from the periphery. By this, these higher cortical centres create a biologically reasonable efferent (motor) response in view of homeostasis within and survival of the individual. Altogether, such superior areas (particularly in the human) allow for cognitive tasks like multisensory and associative information processing, and also for motivation, planning, orientation, and memory within a highly complex social life.

This dissertation has the intention to help understand fundamental working principles of the neocortex (input, intrinsic connectivity, output) by comparing the morphology of the primary neocortical fields in extremely divergent mammalian groups. Here, the consideration of phylogenetic aspects can contribute much to an authentic critical analysis of cortical specifics with regard to their adaptive value for the respective mammals.

The four primary cortical fields (motor [M1], somatosensory [S1], auditory [A1], and visual system [V1]) of mammals as different as primates (human, gorilla), carnivores (dog), ungulates (artiodactyla: pig and sheep) and two representatives of the cetaceans (toothed whales/ odontocetes: harbour porpoise and bottlenose dolphin) are thoroughly compared using a variety of qualitative and quantitative methods. The conventional cytoarchitecture (Nissl and in part Golgi stain) serves as a solid basis expanded by a functional level using immunocytochemical markers (calbindin,

calretinin, parvalbumin and neurofilament). With regard to dolphins (being the main target of this investigation besides the human), stereology was applied as an additional approach in order to obtain neuronal density values within cortical fields and specific layers of two ecologically different species. Based on phylogenetic and evolutionary considerations, the layer III / V horizon was chosen as the "key region" to gain further insight into the functional implications of this peculiar type of cortex.

In general, it becomes clear that the neocortex has undergone an enormous diversification mainly in terrestrial primates. In these animals the four primary cortical fields differ extraordinarily in comparison with other mammals: regarding layering, neuronal composition and intrinsic connectivity, this type of cortex reaches a maximum of complexity. This is particularly obvious in the koniocortical areas consisting of a large number of granular cells (especially in the inner granular layer, layer IV).

In contrast, the holoaquatic dolphins show a strictly aberrant situation. Their neocortex seems to be generally uniform and its intrinsic functionality highly derived: thus there is a sustained trend towards an entirely pyramidal / agranular architecture characterized by the lack of a clear layer IV.

The mammals analyzed here comprise a whole 'neocortical continuum' from granular to agranular architecture and function, both endpoints being found in the two representative mammals (mammalian models): the primates on the one side (granular condition) and the dolphins on the other (agranular condition) with some transitional stages in-between.

The neocortex of the terrestrial carnivore (dog) shows some characteristics being similar to those in primates. In contrast, the ungulates (pig and sheep) exhibit features resembling the situation in dolphins.

It is crucial to note that the secondary adaptation of odontocetes (dolphins) to an entirely aquatic life could have been the main factor in the development of this peculiar type of agranular cortex. Thus the physical parameters of water may have set the framework for evolutionary changes within the brain as a whole. Interestingly, apart from primates (hominids; humans and apes), some neurobiologists attribute prominent cognitive and intellectual abilities also to toothed whales (dolphins) - in spite of the diametrically different organization of their cortex. Whether and to what degree this is true has to be shown in future investigations.

The results of this dissertation call for similar investigations of the non-specific, superimposed neocortical (i.e. secondary, tertiary etc.) associative areas in the future including functional and evolutionary implications.

The overwhelming expansion of the neocortex together with a tremendous increase in the neurobiological capacity of the brain as a whole has led to the emergence of 'free' cortical space not only in primates but, maybe to a lesser degree, also in dolphins. In the human, this surplus in brain mass and 'brain power' may have been the substrate for the emergence of the phylogenetically most recent and cognitively most highly derived features like language, personality and rationality.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adrian ED (1943) Afferent areas in the brain of ungulates. *Brain* 66:89-103.
- Alcantara S, Ferrer I (1995) Postnatal development of calbindin-D28k immunoreactivity in the cerebral cortex of the cat. *Anat Embryol (Berl)* 192:369-384.
- Andressen C, Blumcke I, Celio MR (1993) Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 271:181-208.
- Andrews RJ, Knight RT, Kirby RP (1990) Evoked potential mapping of auditory and somatosensory cortices in the miniature swine. *Neurosci Lett* 114:27-31.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvarday ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Munoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557-568.
- Au WWL, Hastings MC (2008): *Principles of Marine Bioacoustics*. New York, Springer.
- Bailey P, von Bonin G (1951) *The Isocortex of Man*. Urbana: University of Illinois Press.
- Barlow HB (1979) Reconstructing the visual image in space and time. *Nature* 279:189-190.
- Barlow HB (1981) The Ferrier Lecture. Critical limiting factors in the design of the eye and visual cortex. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 212:1-34.
- Baron G (2007) Encephalization: comparative studies of brain size and structure volume in mammals. In: *Evolution of Nervous Systems* (Kaas JH, Krubitzer LA, eds), vol 3, pp 125-135. Oxford, San Diego: Academic Press.
- Bjorge A, Tolley KA (2009): Harbor porpoise *Phocoena phocoena* ; In: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM (eds): *Encyclopedia of Marine Mammals*, ed 2. San Diego: Academic Press, pp 530–532.
- Blümcke I, Hof PR, Morrison JH, Celio MR (1990) Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the visual cortex of Old World monkeys and humans. *J Comp Neurol* 301:417-432.
- Boire D, Desgent S, Matteau I, Ptito M (2005) Regional analysis of neurofilament protein immunoreactivity in the hamster's cortex. *J Chem Neuroanat* 29:193-208.
- Boisserie JR, Lihoreau F, Brunet M (2005) The position of Hippopotamidae within Cetartiodactyla. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1537-1541.
- Bourne JA, Rosa MG (2006) Hierarchical development of the primate visual cortex, as revealed by neurofilament immunoreactivity: early maturation of the middle temporal area (MT). *Cereb Cortex* 16:405-414.



- Bowen, WD, Read AJ, Estes JA (2002) Feeding Ecology. In: Marine Mammal Biology. An Evolutionary Approach (Hoelzel AR, ed), pp 217-246. Malden, MA: Blackwell Science Ltd.
- Braak H (1976) On the striate area of the human isocortex. A Golgi- and pigment architectonic study. *J Comp Neurol* 166:341-364.
- Braak H (1980) Architectonics of the human telencephalic cortex. In: Studies of Brain Function (Barlow HB, Bizzi E, Florey E, Grüsser O-J, Van der Loos H, eds), vol 4. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Braak H (1984) Architectonics as seen by Lipofuscin stains. In: Cerebral Cortex (Peters A, Jones EG, eds), vol 1, pp 59-106. New York und London: Plenum Press.
- Braitenberg V (1985) Charting the visual cortex. In: Cerebral Cortex (Jones EG, Peters A, eds), vol 3, pp 379-411. New York and London: Plenum Press.
- Brodmann K (1905) Beiträge zur histologischen Lokalisation der Grosshirnrinde. Vierte Mitteilung: der Riesenpyramidentypus und sein Verhalten zu den Furchen bei den Karnivoren. *J Psychol Neurol* 6:108-120.
- Brodmann K (1906) Beiträge zur histologischen Lokalisation der Grosshirnrinde. Fünfte Mitteilung: über den allgemeinen Bauplan des Cortex pallii bei den Mammaliern und zwei homologe Rindenfelder im besonderen. Zugleich ein Beitrag zur Furchenlehre. *J Psychol Neurol* 6:275-400.
- Brodmann K (1909) Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde. Leipzig: J.A. Barth.
- Bromiley RB, Pinto Hamuy T, Woolsey CN (1956) Somatic afferent areas I and II of dog's cerebral cortex. *J Neurophysiol* 19:485-499.
- Bullock TH, Gurevich VS (1979) Soviet literature on the nervous system and psychobiology of cetacea. *Int Rev Neurobiol* 21:47-127.
- Butti C, Sherwood CC, Hakeem AY, Allman JM, Hof PR (2009) Total number and volume of Von Economo neurons in the cerebral cortex of cetaceans. *J Comp Neurol* 515:243-259.
- Cajal SR (1893) Neue Darstellung vom histologischen Bau des Centralnervensystems. *Arch Anat Physiol Anat Abt Suppl* (Leipzig), pp 319-428.
- Cajal SR (1909) Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés (transl Azoulay L). Paris: Maloine.
- Campbell AW (1905) Histological Studies on the Localisation of Cerebral Function. London: Cambridge University Press.
- Campbell AW (1916) Histological Studies on the Localisation of Cerebral Function. The Brain of the Gorilla. Reports Pathol Lab Lunacy Dept, New South Wales Govt 3:20-35.
- Campbell MJ, Morrison JH (1989) Monoclonal antibody to neurofilament protein (SMI-32) labels a subpopulation of pyramidal neurons in the human and monkey neocortex. *J Comp Neurol* 282:191-205.
- Coggeshall RE, Lekan HA (1996) Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol* 364:6-15.

- Coleman PD (1997) Research uses of neuropathological data. *Neurobiol Aging* 18:97-98.
- Condé F, Lund JS, Jacobowitz DM, Baimbridge KG, Lewis DA (1994) Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. *J Comp Neurol* 341:95-116.
- Connor RC (2007) Dolphin social intelligence: complex alliance relationships in bottlenose dolphins and a consideration of selective environments for extreme brain size evolution in mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362:587-602.
- Creutzfeldt OD (1977) Generality of the functional structure of the neocortex. *Naturwissenschaften* 64:507-517.
- de Winter W, Oxnard CE (2001) Evolutionary radiations and convergences in the structural organization of mammalian brains. *Nature* 409:710-714.
- Deacon TW (1990) Rethinking mammalian brain evolution. *Am Zool* 30:629-705.
- DeFelipe J (1993) Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex* 3:273-289.
- DeFelipe J (1997) Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 14:1-19.
- DeFelipe J (2002) Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* 136:215-238.
- DeFelipe J, Farinas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563-607.
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG (1989) Visualization of chandelier cell axons by parvalbumin immunoreactivity in monkey cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2093-2097.
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI (2002) Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol* 31:299-316.
- Dehnhardt G (2002) Sensory systems. In: *Marine Mammal Biology. An Evolutionary Approach* (Hoelzel AR, ed), pp 116-141. Malden, MA: Blackwell Science Ltd.
- Deitmer JW, Steinhäuser C (2010) Synaptic processes - The role of glial cells. Preface. *Brain Res Rev* 63:1.
- Ding SL, Van Hoesen GW (2010) Borders, extent, and topography of human perirhinal cortex as revealed using multiple modern neuroanatomical and pathological markers. *Hum Brain Mapp* 31:1359-1379.
- Ding SL, Van Hoesen GW, Cassell MD, Poremba A (2009) Parcellation of human temporal polar cortex: a combined analysis of multiple cytoarchitectonic, chemoarchitectonic, and pathological markers. *J Comp Neurol* 514:595-623.
- Dudek SM, Friedlander MJ (1996) Developmental down-regulation of LTD in cortical layer IV and its independence of modulation by inhibition. *Neuron* 16:1097-1106.

- Dunbar RIM (1992) Neocortex size as a constraint on group size in primates. *J Hum Evol* 22:469-493.
- Dunbar RIM (1998) The social brain hypothesis. *Evol Anthropol* 6:178-190.
- Eccles JC (1984) The cerebral neocortex. A theory of its operation. In: *Cerebral Cortex* (Jones EG, Peters A, eds), vol 2, pp 1-36. New York und London: Plenum Press.
- Eccles JC (1989) *Evolution of the Brain: Creation of Self*. London und New York: Routledge.
- Edinger L (1908) *Vorlesungen über den Bau der Nervösen Zentralorgane des Menschen und der Tiere - für Ärzte und Studierende*. Leipzig: Vogel- Verlag.
- Ellenberger W, Baum H (1912) *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere*. Berlin: Verlag August Hirschwald.
- Elston GN, Rosa MG (2006) Ipsilateral corticocortical projections to the primary and middle temporal visual areas of the primate cerebral cortex: area-specific variations in the morphology of connectionally identified pyramidal cells. *Eur J Neurosci* 23:3337-3345.
- Eriksen N, Pakkenberg B (2007) Total neocortical cell number in the mysticete brain. *Anat Rec (Hoboken)* 290:83-95.
- Fairén A (2007) Cajal and Lorente de Nó on cortical interneurons: coincidences and progress. *Brain Res Rev* 55:430-444.
- Fairén A, DeFelipe J, Regidor J (1984) Nonpyramidal neurons: general account. In: *Cerebral Cortex* (Peters A, Jones EG, eds), vol 1, pp 201-253. New York and London: Plenum Press.
- Felleman DJ, Van Essen DC (1987) Receptive field properties of neurons in area V3 of macaque monkey extrastriate cortex. *J Neurophysiol* 57:889-920.
- Felleman DJ, Van Essen DC (1991) Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 1:1-47.
- Ferrer I (1987) The basic structure of the neocortex in insectivorous bats (*Miniopterus schreibersi* and *Pipistrellus pipistrellus*). A Golgi study. *J Hirnforsch* 28:237-243.
- Ferrer I, Perera M (1988) Structure and nerve cell organisation in the cerebral cortex of the dolphin *Stenella coeruleoalba*, a Golgi study. With special attention to the primary auditory area. *Anat Embryol (Berl)* 178:161-173.
- Fields RD (2005) Myelination: an overlooked mechanism of synaptic plasticity? *Neuroscientist* 11:528-531.
- Fitzpatrick DC, Henson OW Jr (1994) Cell types in the mustached bat auditory cortex. *Brain Behav Evol* 43:79-91.
- Flechsig P (1898) Neue Untersuchungen über die Markbildung in den menschlichen Großhirnlappen. *Neurol Centralbl* 17:977-996.
- Frahm HD, Stephan H, Baron G (1984) Comparison of brain structure volumes in insectivora and primates. V. Area striata (AS). *J Hirnforsch* 25:537-557.
- Fulton JF (1938) Cytoarchitecture of the Gorilla Brain. *Science* 88:426-427.

- Fung C, Schleicher A, Kowalski T, Oelschläger HHA (2005) Mapping auditory cortex in the La Plata dolphin (*Pontoporia blainvillei*). Brain Res Bull 66:353-356.
- Furutani R (2008) Laminar and cytoarchitectonic features of the cerebral cortex in the Risso's dolphin (*Grampus griseus*), striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*), and bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). J Anat 213:241-248.
- Galuske RAW (1994) Neuroanatomische Untersuchungen zur postnatalen Entwicklung intraarealer Axonsysteme im visuellen Kortex der Katze. Dissertation. Fachbereich Humanmedizin, Frankfurt am Main: Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- Garey LJ (1971) A light and electron microscopic study of the visual cortex of the cat and monkey. Proc R Soc Lond B Biol Sci 179:21-40.
- Garey LJ, Leuba G (1986) A quantitative study of neuronal and glial numerical density in the visual cortex of the bottlenose dolphin: evidence for a specialized subarea and changes with age. J Comp Neurol 247:491-496.
- Garey LJ, Revishchin AV (1988) Laminar distribution of cytochrome oxidase activity in the porpoise neocortex. Dokl Akad Nauk SSSR 302:1486-1489.
- Garey LJ, Revishchin AV (1990) Structure and thalamo-cortical relations of the cetacean sensory cortex: histological, tracer and immunocytochemical studies. In: Sensory Abilities of Cetaceans: Laboratory and Field Evidence (Thomas J, Kastelein RA, eds), pp 19-30. New York: Plenum Press.
- Garey LJ, Winkelmann E, Brauer K (1985) Golgi and Nissl studies of the visual cortex of the bottlenose dolphin. J Comp Neurol 240:305-321.
- Garey LJ, Takacs J, Revishchin AV, Hamori J (1989) Quantitative distribution of GABA-immunoreactive neurons in cetacean visual cortex is similar to that in land mammals. Brain Res 485:278-284.
- Geisler JH, Theodor JM (2009) Hippopotamus and whale phylogeny. Nature 458:1-4.
- Gemoll, W. (1965): Griechisch- deutsches Schul- und Handwörterbuch. 9. Auflage. München: Oldenbourg- Verlag.
- Gerhardt E (1940) Die Cytoarchitektonik des Isokortex parietalis beim Menschen. J Psychol Neurol 49:367-419.
- Gilbert CD, Wiesel TN (1983) Functional organization of the visual cortex. Prog Brain Res 58:209-218.
- Glaser J, Greene G, Hendricks S (2007) Stereology for Biological Research. Williston, VT (USA): MBF Press.
- Glezer II (2002) Neural morphology. In: Marine Mammal Biology (Hoelzel AR, ed), pp 98-115. Malden, USA: Blackwell Science.
- Glezer II, Morgane PJ (1990) Ultrastructure of synapses and Golgi analysis of neurons in neocortex of the lateral gyrus (visual cortex) of the dolphin and Pilot Whale. Brain Res Bull 24:401-427.
- Glezer II, Jacobs MS, Morgane PJ (1988) Implications of the "initial brain" concept for brain evolution in Cetacea. Behav Brain Sci 11:75-116.
- Glezer II, Morgane PJ, Leranth C (1991) Immunocytochemistry of neurotransmitters in visual neocortex of several toothed whales: light and electron microscopic

- study. In: Sensory Abilities of Cetaceans: Laboratory and Field Evidence (Thomas J, Kastelein RA, eds), pp 39-67. New York: Plenum Press.
- Glezer, II, Hof PR, Morgane PJ (1998) Comparative analysis of calcium-binding protein-immunoreactive neuronal populations in the auditory and visual systems of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and the macaque monkey (*Macaca fascicularis*). J Chem Neuroanat 15:203-237.
- Glezer II, Hof PR, Csaba L, Morgane PJ (1992) Morphological and histochemical features of odontocete visual neocortex: immunocytochemical analysis of pyramidal and non-pyramidal populations of neurons. In: Marine Mammal Sensory Systems (Thomas J, Kastelein RA, Supin AY, eds), pp 1-38. New York: Plenum Press.
- Glezer, II, Hof PR, Leranth C, Morgane PJ (1993) Calcium-binding protein-containing neuronal populations in mammalian visual cortex: a comparative study in whales, insectivores, bats, rodents, and primates. Cereb Cortex 3:249-272.
- Goldshmit Y, Galley S, Foo D, Sernagor E, Bourne JA (2010) Anatomical changes in the primary visual cortex of the congenitally blind Crx<sup>-/-</sup> mouse. Neuroscience 166:886-898.
- Goller H, Hummel G (1974) Zur Zytoarchitektur der Großhirnrinde der Hauswiederkäuer. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 87:129-133.
- Gonchar Y, Burkhalter A (1997) Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. Cereb Cortex 7:347-358.
- Gonchar Y, Burkhalter A (1999) Connectivity of GABAergic calretinin-immunoreactive neurons in rat primary visual cortex. Cereb Cortex 9:683-696.
- Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A (2007) Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. Front Neuroanat 1:3.
- Gorska T (1974) Functional organization of cortical motor areas in adult dogs and puppies. Acta Neurobiol Exp (Wars) 34:171-203.
- Gray CM, Singer W (1989) Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. Proc Natl Acad Sci USA 86:1698-1702.
- Güntürkün O (2005) The avian 'prefrontal cortex' and cognition. Curr Opin Neurobiol 15:686-693.
- Harrison PJ (1999) The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. Brain 122 ( pt 4):593-624.
- Hassiotis M, Paxinos G, Ashwell KW (2004) Cyto- and chemoarchitecture of the cerebral cortex of the Australian echidna (*Tachyglossus aculeatus*). I. Areal organization. J Comp Neurol 475:493-517.
- Heinsen H, Arzberger T, Schmitz C (2000) Celloidin mounting (embedding without infiltration) - a new, simple and reliable method for producing serial sections of high thickness through complete human brains and its application to stereological and immunohistochemical investigations. J Chem Neuroanat 20:49-59.

- Hendry SH, Jones EG (1981) Sizes and distributions of intrinsic neurons incorporating tritiated GABA in monkey sensory-motor cortex. *J Neurosci* 1:390-408.
- Hendry SH, Jones EG (1983) The organization of pyramidal and non-pyramidal cell dendrites in relation to thalamic afferent terminations in the monkey somatic sensory cortex. *J Neurocytol* 12:277-298.
- Hendry SH, Jones EG, Emson PC, Lawson DE, Heizmann CW, Streit P (1989) Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. *Exp Brain Res* 76:467-472.
- Herold C, Palomero-Gallagher N, Hellmann B, Kroner S, Theiss C, Güntürkün O, Zilles K (2011) The receptor architecture of the pigeons' nidopallium caudolaterale: an avian analogue to the mammalian prefrontal cortex. *Brain Structure Function* DOI: 10.1007/s00429-011-0301-5.
- Hersch SM, White EL (1981) Thalamocortical synapses with corticothalamic projection neurons in mouse Sml cortex: electron microscopic demonstration of a monosynaptic feedback loop. *Neurosci Lett* 24:207-210.
- Hersch SM, White EL (1982) A quantitative study of the thalamocortical and other synapses in layer IV of pyramidal cells projecting from mouse Sml cortex to the caudate-putamen nucleus. *J Comp Neurol* 211:217-225.
- Hilgetag CC, Barbas H (2009) Are there ten times more glia than neurons in the brain? *Brain Struct Funct* 213:365-366.
- Hof PR, Nimchinsky EA (1992) Regional distribution of neurofilament and calcium-binding proteins in the cingulate cortex of the macaque monkey. *Cereb Cortex* 2:456-467.
- Hof PR, Morrison JH (1995) Neurofilament protein defines regional patterns of cortical organization in the macaque monkey visual system: a quantitative immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol* 352:161-186.
- Hof PR, Sherwood CC (2005) Morphomolecular neuronal phenotypes in the neocortex reflect phylogenetic relationships among certain mammalian orders. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 287:1153-1163.
- Hof PR, Sherwood CC (2007) The evolution of neuron classes in the neocortex of mammals. In: *Evolution of Nervous Systems* (Kaas JH, Preuss TM, eds), vol 4, pp 114-124. Oxford, San Diego: Academic Press.
- Hof PR, Cox K, Morrison JH (1990) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J Comp Neurol* 301:44-54.
- Hof PR, Nimchinsky EA, Morrison JH (1995) Neurochemical phenotype of corticocortical connections in the macaque monkey: quantitative analysis of a subset of neurofilament protein-immunoreactive projection neurons in frontal, parietal, temporal, and cingulate cortices. *J Comp Neurol* 362:109-133.
- Hof PR, Rosenthal RE, Fiskum G (1996b) Distribution of neurofilament protein and calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the canine hippocampus. *J Chem Neuroanat* 11:1-12.
- Hof PR, Chanis R, Marino L (2005) Cortical complexity in cetacean brains. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 287:1142-1152.



- Hof PR, Bogaert YE, Rosenthal RE, Fiskum G (1996a) Distribution of neuronal populations containing neurofilament protein and calcium-binding proteins in the canine neocortex: regional analysis and cell typology. *J Chem Neuroanat* 11:81-98.
- Hof PR, Glezer II, Nimchinsky EA, Erwin JM (2000) Neurochemical and cellular specializations in the mammalian neocortex reflect phylogenetic relationships: evidence from primates, cetaceans, and artiodactyls. *Brain Behav Evol* 55:300-310.
- Hof PR, Glezer II, Archin N, Janssen WG, Morgane PJ, Morrison JH (1992) The primary auditory cortex in cetacean and human brain: a comparative analysis of neurofilament protein-containing pyramidal neurons. *Neurosci Lett* 146:91-95.
- Hof PR, Ungerleider LG, Webster MJ, Gattass R, Adams MM, Sailstad CA, Morrison JH (1996c) Neurofilament protein is differentially distributed in subpopulations of corticocortical projection neurons in the macaque monkey visual pathways. *J Comp Neurol* 376:112-127.
- Hof PR, Glezer II, Conde F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, Vogt-Weisenhorn DM (1999) Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat* 16:77-116.
- Hornung JP, Garey LJ (1981) The thalamic projection to cat visual cortex: ultrastructure of neurons identified by Golgi impregnation or retrograde horseradish peroxidase transport. *Neuroscience* 6:1053-1068.
- Horton JC, Hubel DH (1981) Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual cortex of macaque monkey. *Nature* 292:762-764.
- Houser CR, Vaughn JE, Hendry SHC, Jones EG, Peters A (1984) GABA neurons in the cerebral cortex. In: *Cerebral Cortex* (Jones EG, Peters A, eds), vol 2, pp 63-89. New York und London: Plenum Press.
- Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* 160:106-154.
- Hubel DH, Wiesel TN (1968) Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *J Physiol* 195:215-243.
- Hubel DH, Wiesel TN (1972) Laminar and columnar distribution of geniculo-cortical fibers in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 146:421-450.
- Hubel DH, Wiesel TN (1977) Ferrier lecture. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 198:1-59.
- Huggenberger S (2008) The size and complexity of dolphin brains - a paradox? *J Mar Biol Assoc UK* 88:1103-1108.
- Huggenberger S, Rauschmann MA, Vogl TJ, Oelschläger HHA (2009) Functional morphology of the nasal complex in the harbor porpoise (*Phocoena phocoena* L.). *Anat Rec (Hoboken)* 292:902-920.
- Hummel G (1975) Lichtmikroskopische, elektronenmikroskopische und enzymhistochemische Untersuchungen an der Großhirnrinde von Rind, Schaf und Ziege. *J Hirnforsch* 16:245-285.

- Hummel G (1987) Bau und Funktion des Zentralnervensystems der Haustiere. *Tierärztliche Praxis* 15:1-10.
- Humphrey NK (1976) The social function of intellect. In: *Growing points in ethology* (Bateson PPG, Hinde RA, eds), pp 303-317. Cambridge: Cambridge University Press.
- Huntley GW, Vickers JC, Janssen W, Brose N, Heinemann SF, Morrison JH (1994) Distribution and synaptic localization of immunocytochemically identified NMDA receptor subunit proteins in sensory-motor and visual cortices of monkey and human. *J Neurosci* 14:3603-3619.
- Jarvinen MK, Morrow-Tesch J, McGlone JJ, Powley TL (1998) Effects of diverse developmental environments on neuronal morphology in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Brain Res Dev Brain Res* 107:21-31.
- Jerison HJ (1973) *Evolution of the Brain and Intelligence*. New York: Academic Press.
- Jerison HJ (1982) Allometry, brain size, cortical surface and convolutedness. In: *Primate Brain Evolution. Methods and Concepts* (Armstrong E, Falk D, eds). New York: Plenum.
- Johnson JI, Rubel EW, Hatton GI (1974) Mechanosensory projections to cerebral cortex of sheep. *J Comp Neurol* 158:81-107.
- Jones EG (1975) Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 160:205-267.
- Jones EG (1984) Laminar distribution of cortical efferent cells. In: *Cerebral Cortex* (Peters A, Jones EG, eds), vol 1, pp 521-553. New York und London: Plenum Press.
- Jones EG (2009) The origins of cortical interneurons: mouse versus monkey and human. *Cereb Cortex* 19:1953-1956.
- Kahle W (1975) Endhirn. In: *Taschenatlas der Anatomie. Nervensystem und Sinnesorgane*, pp 207-267. Stuttgart: Georg Thieme- Verlag.
- Kätzel D, Zemelman BV, Buetfering C, Wölfel M, Miesenböck G (2011) The columnar and laminar organization of inhibitory connections to neocortical excitatory cells. *Nat Neurosci* 14:100-107.
- Kern A, Seidel K, Oelschläger HHA (2009) The central vestibular complex in dolphins and humans: functional implications of Deiters' nucleus. *Brain Behav Evol* 73:102-110.
- Kern A, Siebert U, Cozzi B, Hof PR, Oelschläger HHA (2011) Stereology of the neocortex in odontocetes: qualitative, quantitative, and functional implications. *Brain Behavior and Evolution*. DOI: 10.1159/000323674.
- Kesarev VS (1970) Hirnstruktur bei Delphin und Mensch. *Ideen des exakten Wissens* 7:391-398.
- Kesarev VS (1971) The inferior brain of the dolphin. *Soviet Science Review*:53-58.
- Kesarev VS, Malofeyeva LI (1969) Structural organization of the motor zone of the cerebral cortex in dolphins. *Arkh Anat Gistol Embriol* 56:48-55.

- Kesarev VS, Malofeyeva LI, Trykova OV (1977) Ecological specificity of cetacean neocortex. *J Hirnforsch* 18:447-460.
- Ketten DR (1998): Marine Mammals Auditory Systems: A Summary of Audiometric and Anatomical Data and Its Implications for Underwater Acoustic Impacts. Boston, NMFS.
- Kinze CC (1994): *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758) – Schweinswal oder Kleintümmler; In: Niethammer J, Krapp F (eds): Handbuch der Säugetiere Europas, Meeressäuger (vol 6, Teil I A): Robineau D, Duguy R, Klima M (eds): Wale und Delphine – Cetacea. Wiesbaden, Aula, pp 242–264.
- Kirkcaldie MT, Dickson TC, King CE, Grasby D, Riederer BM, Vickers JC (2002) Neurofilament triplet proteins are restricted to a subset of neurons in the rat neocortex. *J Chem Neuroanat* 24:163-171.
- Kojima T (1951) On the brain of the sperm whale (*Physeter catadon* L.). *Sci Rep Whales Res Inst Tokyo* 6:49-72.
- Krapp F, Niethammer J (1990) Insectivora. In: Handbuch der Säugetiere Europas (Niethammer J, Krapp F eds), vol 3/1. Wiesbaden: Aula-Verlag, pp 13- 484.
- Kraus C, Pilleri G (1969a) Quantitative Untersuchungen über die Großhirnrinde der Cetaceen. In: Investigations on Cetacea (Pilleri G, ed), vol 1, pp 127-150. Institute of Brain Anatomy: University of Berne (Switzerland).
- Kraus C, Pilleri G (1969b) Zur Feinstruktur der großen Pyramidenzellen in der V. Cortexschicht bei Cetaceen (*Delphinus delphis* und *Balaenoptera borealis*). *Z Mikrosk Anat Forsch* 80:89-99.
- Kraus C, Pilleri G (1969c) Zur Großhirnrinde von *Balaenoptera borealis* Lesson (Cetacea, Mysticeti). In: Investigations on Cetacea (Pilleri G, ed), vol 1, pp 151-170. Institute of Brain Anatomy: University of Berne (Switzerland).
- Kraus C, Pilleri G (1972) On the histology of the large pyramidal cells in cortical layer V of cetaceans (*Delphinus delphis* and *Balaenoptera borealis*). In: Investigations on Cetacea (Pilleri G, ed), vol 4, pp 207-214. Institute of Brain Anatomy: University of Berne (Switzerland).
- Kruger L (1966) Specialized features of the cetacean brain. In: Whales, Dolphins, and Porpoises (Norris KS, ed), pp 232-254. Berkeley and Los Angeles: University of California Press.
- Kudo H, Dunbar RIM (2001) Neocortex size and social network size in primates. *Anim Behav* 62:711-722.
- Kuroda M, Murakami K, Oda S, Shinkai M, Kishi K (1993) Direct synaptic connections between thalamocortical axon terminals from the mediodorsal thalamic nucleus (MD) and corticothalamic neurons to MD in the prefrontal cortex. *Brain Res* 612:339-344.
- Ladygina TF, Supin AY (1977) Localization of the sensory projection areas in the cerebral cortex of the dolphin, *Tursiops truncatus*. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 13:712-718.
- Ladygina TF, Mass AM, Supin AY (1978) Multiple sensory projections in the dolphin cerebral cortex. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 28:1047-1054.

- Langenscheidts Taschenwörterbuch Altgriechisch. 35. Auflage 1977. Berlin: Langenscheidtsche Verlagsbuchhandlung.
- Lee CC, Winer JA (2008) Connections of cat auditory cortex: II. Commissural system. *J Comp Neurol* 507:1901-1919.
- Lende RA, Welker WI (1972) An unusual sensory area in the cerebral neocortex of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *Brain Res* 45:555-560.
- Leonhardt H, Lange W (1987) Graue und weiße Substanz des Hirnstammes (Rautenhirn). In: Rauber/Kopsch Anatomie des Menschen (Leonhardt H, Töndury G, Zilles K, eds). Stuttgart, New York: Georg Thieme- Verlag.
- Lewis JW, Van Essen DC (2000) Mapping of architectonic subdivisions in the macaque monkey, with emphasis on parieto-occipital cortex. *J Comp Neurol* 428:79-111.
- Leyton ASF, Sherrington CS (1917) Observations on the excitable cortex of the Chimpanzee, Orang-Utan, and Gorilla. *Exp. Physiol.* 11:135-222.
- Linden DJ (2007) *The Accidental Mind. How Brain Evolution Has Given Us Love, Memory, Dreams and God.* Cambridge: Harvard University Press.
- Livingstone MS, Hubel DH (1982) Thalamic inputs to cytochrome oxidase-rich regions in monkey visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6098-6101.
- Lorente de Nó R (1922) La corteza cerebral del ratón. *Trabajos Cajal Madrid* 20:41-80.
- Lorente de Nó R (1938) The cerebral cortex: architecture, intracortical connections and motor projections. In: *Physiology of the Nervous System* (Fulton JF, ed), pp 291-325. London: Oxford University Press.
- Lund JS (1973) Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the monkey (*Macaca mulatta*). *J Comp Neurol* 147:455-496.
- Lund JS (1984) Spiny stellate neurons. In: *Cerebral Cortex* (Peters A, Jones EG, eds), vol 1, pp 255-308. New York and London: Plenum Press.
- Lund JS, Boothe RG (1975) Interlaminar connections and pyramidal neuron organisation in the visual cortex, area 17, of the Macaque monkey. *J Comp Neurol* 159:305-334.
- Lund JS, Lewis DA (1993) Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: Golgi and immunocytochemical characteristics. *J Comp Neurol* 328:282-312.
- Lund JS, Hawken MJ, Parker AJ (1988) Local circuit neurons of macaque monkey striate cortex: II. Neurons of laminae 5B and 6. *J Comp Neurol* 276:1-29.
- Lund JS, Henry GH, MacQueen CL, Harvey AR (1979) Anatomical organization of the primary visual cortex (area 17) of the cat. A comparison with area 17 of the macaque monkey. *J Comp Neurol* 184:599-618.
- Lyon DC, Nassi JJ, Callaway EM (2010) A disynaptic relay from superior colliculus to dorsal stream visual cortex in macaque monkey. *Neuron* 65:270-279.
- Manger PR (2006) An examination of cetacean brain structure with a novel hypothesis correlating thermogenesis to the evolution of a big brain. *Biol Rev Camb Philos Soc* 81:293-338.

- Marino L (1995) Brain-Behavior Relationships in Cetaceans and Primates: Implications for the Evolution of Complex Intelligence. Dissertation. Department of Psychology, pp 1-382. New York: University of Albany.
- Marino L (1998) A comparison of encephalization between odontocete cetaceans and anthropoid primates. *Brain Behav Evol* 51:230-238.
- Marino L (2002) Convergence of complex cognitive abilities in cetaceans and primates. *Brain Behav Evol* 59:21-32.
- Marino L (2004) Dolphin cognition. *Curr Biol* 14:R910-911.
- Marino L (2007) Cetacean brain evolution. In: *Evolution of Nervous Systems* (Kaas JH, Krubitzer LA, eds), vol 3, pp 261-266. Oxford, San Diego: Academic Press.
- Marino L, McShea DW, Uhen MD (2004) Origin and evolution of large brains in toothed whales. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 281:1247-1255.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.
- Mauss T (1911) Die faserarchitektonische Gliederung des Cortex cerebri der anthropomorphen Affen. *J Psychol Neurol* 18:410-467.
- Meier H, Ploog D (1997) *Der Mensch und sein Gehirn*. München: Piper.
- Meyer G, Gonzalez-Hernandez TH, Ferres-Torres R (1989) The spiny stellate neurons in layer IV of the human auditory cortex. A Golgi study. *Neuroscience* 33:489-498.
- Moore JK, Guan YL (2001) Cytoarchitectural and axonal maturation in human auditory cortex. *J Assoc Res Otolaryngol* 2:297-311.
- Morgane PJ, Jacobs MS (1972) Comparative anatomy of the cetacean nervous system. In: *Functional Anatomy of Marine Mammals* (Harrison RJ, ed), vol. 1, pp 117-244. London: Academic Press.
- Morgane PJ, Glezer II (1990) Sensory neocortex in dolphin brain. In: *Sensory Abilities of Cetaceans Laboratory and Field Evidence* (Thomas JA, Kastelein RA, eds). NATO ASI Series A: Life Sciences, Rome, Italy, pp 107-136. New York: Plenum Press.
- Morgane PJ, Jacobs MS, Galaburda A (1985) Conservative features of neocortical evolution in dolphin brain. *Brain Behav Evol* 26:176-184.
- Morgane PJ, Jacobs MS, Galaburda A (1986a) Evolutionary aspects of cortical organization in the dolphin brain. In: *Research on Dolphins* (Harrison RJ, Bryden M, eds), pp 71-98. Oxford: Oxford University Press.
- Morgane PJ, Jacobs MS, Galaburda A (1986b) Evolutionary Morphology of the Dolphin Brain. In: *Dolphin Cognition and Behavior. A Comparative Approach* (Schustermann R, Thomas J, Wood F, eds). Hillsdale, N. J.: Lawrence Erlbaum Associates.
- Morgane PJ, Jacobs MS, Glezer II (1986c) Ultrastructural features of visual cortex of the dolphin. *Society for Neuroscience Abstracts* 12:105.
- Morgane PJ, Glezer II, Jacobs MS (1988) Visual cortex of the dolphin: an image analysis study. *J Comp Neurol* 273:3-25.

- Morgane PJ, Glezer II, Jacobs MS (1990) Comparative and evolutionary anatomy of the visual cortex of the dolphin. In: Cerebral Cortex (Jones EG, Peters A, eds), vol 8B, pp 215-262. New York und London: Plenum Press.
- Morisaka T, Connor RC (2007): Predation by killer whales (*Orcinus orca*) and the evolution of whistle loss and narrow-band high frequency clicks in odontocetes. *J Evol Biol* 20: 1439–1458.
- Morrison JH, Hof PR, Huntley GW (1998) Neurochemical organization of the primate visual cortex. In: The Primate Nervous System: Handbook of Chemical Neuroanatomy (Bloom FE, Björklund A, Hökfelt T, eds), vol 14, pp 299-430. New York: Elsevier.
- Mountcastle VB (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol* 20:408-434.
- Murphy WJ, Pevzner PA, O'Brien SJ (2004) Mammalian phylogenomics comes of age. *Trends Genet* 20:631-639.
- Nakamura H, Gattass R, Desimone R, Ungerleider LG (1993) The modular organization of projections from areas V1 and V2 to areas V4 and TEO in macaques. *J Neurosci* 13:3681-3691.
- Nakamura H, Le WR, Wakita M, Mikami A, Itoh K (2004) Projections from the cytochrome oxidase modules of visual area V2 to the ventral posterior area in the macaque. *Exp Brain Res* 155:102-110.
- Nassi JJ, Callaway EM (2007) Specialized circuits from primary visual cortex to V2 and area MT. *Neuron* 55:799-808.
- Nassi JJ, Callaway EM (2009) Parallel processing strategies of the primate visual system. *Nat Rev Neurosci* 10:360-372.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1984) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV. Berlin, Hamburg: Parey.
- Nieuwenhuys R (1994) The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. *Anat Embryol (Berl)* 190:307-337.
- Nieuwenhuys R (1998) Neocortex. In: The Central Nervous System of Vertebrates (Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson C, eds), vol 3, pp 1952-2008. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer.
- Nimchinsky EA, Hof PR, Young WG, Morrison JH (1996) Neurochemical, morphologic, and laminar characterization of cortical projection neurons in the cingulate motor areas of the macaque monkey. *J Comp Neurol* 374:136-160.
- Nimchinsky EA, Vogt BA, Morrison JH, Hof PR (1997) Neurofilament and calcium-binding proteins in the human cingulate cortex. *J Comp Neurol* 384:597-620.
- Oakley DA (1979) Cerebral cortex and adaptive behaviour. In: Brain, Behaviour and Evolution (Oakley DA, Plotkin HC, eds), pp 154-188. London: Methuen.
- Oelschläger HH (2008) The dolphin brain - a challenge for synthetic neurobiology. *Brain Res Bull* 75:450-459.
- Oelschläger HH, Kemp B (1998) Ontogenesis of the sperm whale brain. *J Comp Neurol* 399:210-28.



- Oelschläger HHA, Oelschläger JS (2002) Brain. In: Encyclopedia of Marine Mammals (Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM, eds), pp 133-158. San Diego: Academic Press.
- Oelschläger HHA, Oelschläger JS (2009) Brain. In: Encyclopedia of Marine Mammals (Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM, eds), pp 134-149. San Diego: Academic Press.
- Oelschläger HH, Ridgway SH, Knauth M (2010) Cetacean brain evolution: Dwarf sperm whale (*Kogia sima*) and common dolphin (*Delphinus delphis*) - An investigation with high-resolution 3D MRI. *Brain Behav Evol* 75:33-62.
- Oelschläger HH, Haas-Rioth M, Fung C, Ridgway SH, Knauth M (2008) Morphology and evolutionary biology of the dolphin (*Delphinus sp.*) brain-MR imaging and conventional histology. *Brain Behav Evol* 71:68-86.
- Olshausen BA, Anderson CH, Van Essen DC (1993) A neurobiological model of visual attention and invariant pattern recognition based on dynamic routing of information. *J Neurosci* 13:4700-4719.
- Pakkenberg B, Gundersen HJ (1997) Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol* 384:312-320.
- Paxinos G, Kus L, Ashwell KWS, Watson C (1999) Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Forebrain. San Diego: Academic Press.
- Penfield W (1964) Speech, perception and the uncommitted cortex. In: *Brain and Conscious Experience* (Eccles JC, ed). New York: Springer Verlag.
- Penfield W (1975) *The Mystery of Mind: A Critical Study of Consciousness and the Human Brain*. Princeton: Princeton University Press.
- Peters A, Fairén A (1978) Smooth and sparsely-spined stellate cells in the visual cortex of the rat: a study using a combined Golgi-electron microscopic technique. *J Comp Neurol* 181:129-171.
- Peters A, Jones EG (1984) Classification of cortical neurons. In: *Cerebral Cortex* (Peters A, Jones EG, eds), vol 1, pp 107-122. New York und London: Plenum Press.
- Peters A, Palay SL, de Webster FH (1989) *The Fine Structure of the Nervous System: the Neurons and Supporting Elements*. Philadelphia: Saunders.
- Pilleri G, Kraus C (1969) Zum Aufbau des Cortex bei Cetaceen. *Rev Suisse Zool* 76:760-767.
- Pilleri G, Kraus C, Gühr M (1968) The structure of the cerebral cortex of the Ganges dolphin *Susu (Platanista gangetica)* Lebeck 1801. *Z Mikrosk Anat Forsch* 79:373-388.
- Popov VV, Ladygina TF, Supin A (1986) Evoked potentials of the auditory cortex of the porpoise, *Phocoena phocoena*. *J Comp Physiol [A]* 158:705-711.
- Popova NS (1968) Dynamics of evoked potential parameters in different regions of the visual cortex and surrounding cortical fields in dogs during defensive conditioning. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 18:940-950.
- Poth C, Fung C, Güntürkün O, Ridgway SH, Oelschläger HHA (2005) Neuron numbers in sensory cortices of five delphinids compared to a physterid, the pygmy sperm whale. *Brain Res Bull* 66:357-360.

- Preobrashenskaja NS, Kesarew WS, Stankewitsch IA, Minajewa WM (1973) Morphologische Gesetzmäßigkeiten der Evolution des Großhirns. *Z Mikrosk Anat Forsch* 87:490-504.
- Preuss TM (1995) The argument from animals to humans in cognitive neuroscience. In: *The Cognitive Neurosciences* (Gazzaniga MS, ed), pp 1227-1241. Cambridge, MA: MIT Press.
- Preuss TM (2001) The discovery of cerebral diversity: an unwelcome scientific revolution. In: *Evolutionary Anatomy of Primate Cerebral Cortex* (Falk D, Gibson KR, eds), pp 138-164. Cambridge: Cambridge University Press.
- Pritz-Hohmeier S, Hartig W, Behrmann G, Reichenbach A (1994) Immunocytochemical demonstration of astrocytes and microglia in the whale brain. *Neurosci Lett* 167:59-62.
- Rager G, Zenker W, Braak H, Braak E, Nitsch R, Asan E (2004) Endhirn. In: *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie* (Drenckhahn D, ed), vol 2, pp 484-502. München: Elsevier.
- Ramon y Cajal S (1910) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris, Maloine.
- Reep RL, Finlay BL, Darlington RB (2007) The limbic system in mammalian brain evolution. *Brain Behav Evol* 70:57-70.
- Revishchin AV, Garey LJ (1990) The thalamic projection to the sensory neocortex of the porpoise, *Phocoena phocoena*. *J Anat* 169:85-102.
- Revishchin AV, Garey LJ (1991) Laminar distribution of cytochrome oxidase staining in cetacean isocortex. *Brain Behav Evol* 37:355-367.
- Ribak CE (1978) Aspinous and sparsely-spinous stellate neurons in the visual cortex of rats contain glutamic acid decarboxylase. *J Neurocytol* 7:461-478.
- Rice DW (1998) *Marine Mammals of the World. Systematics and Distribution*. Special Publication Number 4. The Society of Marine Mammalogy. Lawrence, KS 66044–8897: Allen Press.
- Ridgway, SH (1990): The central nervous system of the bottlenose dolphin; In: Leatherwood S, Reeves RR (eds): *The Bottlenose Dolphin*. New York, Academic Press, pp 69–97.
- Ridgway SH (2000) The auditory central nervous system of dolphins. In: *Hearing by Whales and Dolphins* (Au WWL, Popper AN, Fay RR, eds). New York: Springer.
- Ridgway SH, Brownson RH (1984) Relative brain sizes and cortical surface areas in odontocetes. *Acta Zool Fennica* 172:149-152.
- Rockel AJ, Hiorns RW, Powell TP (1980) The basic uniformity in structure of the neocortex. *Brain* 103:221-244.
- Rogers JH (1992) Immunohistochemical markers in rat cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA. *Brain Res* 587:147-157.
- Romer AS, Parsons TS (1977) *The Vertebrate Body*. Philadelphia: Saunders College Publishing.

- Rose M (1935) Cytoarchitektonik und Myeloarchitektonik der Großhirnrinde. In: Handbuch der Neurologie, vol. 1 (Bumke O, Förster O, eds), pp 588-778. Berlin: Springer.
- Rosoklija G, Mancevski B, Ilievski B, Perera T, Lisanby SH, Coplan JD, Duma A, Serafimova T, Dwork AJ (2003) Optimization of Golgi methods for impregnation of brain tissue from humans and monkeys. J Neurosci Methods 131:1-7.
- Roth G, Dicke U (2005) Evolution of the brain and intelligence. Trends Cogn Sci 9:250-257.
- Russell S (1979) Brain size and intelligence: a comparative perspective. In: Brain, Behaviour and Evolution (Oakley DA, Plotkin HC, eds), pp126-153. London: University Press.
- Saint Marie RL, Peters A (1985) The morphology and synaptic connections of spiny stellate neurons in monkey visual cortex (area 17): a Golgi-electron microscopic study. J Comp Neurol 233:213-235.
- Sakai M, Hishii T, Takeda S, Kohshima S (2006) Flipper rubbing behaviors in wild bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). Mar Mamm Sci 22:966-978.
- Sanides F, Sanides D (1972) The "extraverted neurons" of the mammalian cerebral cortex. Z Anat Entwicklungsgesch 136:272-293.
- Scanziani M, Häusser M (2009) Electrophysiology in the age of light. Nature 461:930-939.
- Schmitz C, Hof PR (2000) Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. J Chem Neuroanat 20:93-114.
- Schmitz C, Hof PR (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience 130:813-831.
- Schwerdtfeger WK, Oelschläger HA, Stephan H (1984) Quantitative neuroanatomy of the brain of the La Plata dolphin, *Pontoporia blainvillei*. Anat Embryol (Berl) 170:11-19.
- Seldon HL (1985) The Anatomy of Speech Perception: Human Auditory Cortex. In: Cerebral Cortex (Peters A, Jones EG, eds), vol 4, pp 273-327. New York and London: Plenum Press.
- Sherwood CC, Stimpson CD, Butti C, Bonar CJ, Newton AL, Allman JM, Hof PR (2009) Neocortical neuron types in Xenarthra and Afrotheria: implications for brain evolution in mammals. Brain Struct Funct 213:301-328.
- Shu SY, Ju G, Fan LZ (1988) The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. Neurosci Lett 85:169-171.
- Simpson S, King JL (1911) Localisation of the motor area in the sheep. Q J Exp Physiol 4:53-65.
- Slijper EJ (1979) Whales. Cornell University Press: Ithaca, New York.
- Smith PH, Populin LC (2001) Fundamental differences between the thalamocortical recipient layers of the cat auditory and visual cortices. J Comp Neurol 436:508-519.

- Sokolov VE, Ladygina TF, Supin AY (1972) Localization of sensory zones in the dolphin cerebral cortex. Dokl Akad Nauk SSSR 202:92-95.
- Stephan H (1960a) Die quantitative Zusammensetzung der Oberflächen des Allocortex bei Insektivoren und Primaten. In: Structure and Function of the Cerebral Cortex (Tower DB, Schadé JP, eds). Amsterdam, London, New York, Princeton: Elsevier.
- Stephan H (1960b) Methodische Studien über den quantitativen Vergleich architektonischer Struktureinheiten des Gehirns. Z wiss Zool 164:143-172.
- Stephan H (1967) Zur Entwicklungshöhe der Insektivoren nach Merkmalen des Gehirns und die Definition der "Basalen Insektivoren". Zool Anz 179:177-199.
- Stephan H (1983) Evolutionary trends in limbic structures. Neurosci Biobehav Rev 7:367-374.
- Stephan H, Andy OJ (1964) Quantitative comparisons of brain structures from insectivores to primates. American Zoologist 4:59-74.
- Stephan H, Andy OJ (1969) Quantitative comparative neuroanatomy of primates: an attempt at a phylogenetic interpretation. In: Comparative and Evolutionary Aspects of the Vertebrate Central Nervous System (Albertson PD, Krauss M, Petras JM, Noback CR, eds), vol 167, pp 370-387. New York: The New York Academy of Sciences.
- Stephan H, Andy OJ (1970) The allocortex in primates. In: The primate brain (Noback CR, Montagna W, eds), pp 289-297. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Stephan H, Frahm H, Baron G (1981) New and revised data on volumes of brain structures in insectivores and primates. Folia Primatol (Basel) 35:1-29.
- Sternberger LA, Sternberger NH (1983) Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. Proc Natl Acad Sci USA 80:6126-6130.
- Stimpson CD, Tetreault NA, Allman JM, Jacobs B, Butti C, Hof PR, Sherwood CC (2011) Biochemical specificity of von Economo neurons in hominoids. Am J Hum Biol 23:22-28.
- Storch V, Welsch U, Wink M (2001) Evolutionsbiologie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Striedter GF (2005) Principles of Brain Evolution. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- Supin AY, Popov VV, Mass AM (2001): The Sensory Physiology of Aquatic Mammals. London, Kluwer.
- Szentágothai J (1970) Neuronal circuits of the cerebral cortex. Bull Acad R Med Belg 10:475-492.
- Szentágothai J (1975) The 'module-concept' in cerebral cortex architecture. Brain Res 95:475-496.
- Szentágothai J (1978) The Ferrier Lecture, 1977. The neuron network of the cerebral cortex: a functional interpretation. Proc R Soc Lond B Biol Sci 201:219-248.

- Szentágothai J (1979) Local neuron circuits of the neocortex. In: The Neurosciences Fourth Study Program (Schmitt FO, Worden FG, eds), pp 399-415. Cambridge, MA: MIT Press.
- Tarpley RJ, Ridgway SH (1994) Corpus callosum size in delphinid cetaceans. *Brain Behav Evol* 44:156-165.
- Thewissen JGM, Williams EM (2002) The early radiations of cetacea (mammalia): evolutionary pattern and developmental correlations. *Annu Rev Ecol Syst* 33:73-90.
- Tiesinga P, Fellous JM, Sejnowski TJ (2008) Regulation of spike timing in visual cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 9:97-107.
- Tiesinga PH, Fellous JM, Jose JV, Sejnowski TJ (2002) Information transfer in entrained cortical neurons. *Network* 13:41-66.
- Tunturi AR (1944) Audio frequency localization in the acoustic cortex of the dog. *Am J Physiol* 141:397-402.
- Tunturi AR (1945) Further afferent connections to the acoustic cortex of the dog. *Am J Physiol* 144:389-394.
- Tunturi AR (1950) Physiological determination of the boundary of the acoustic area in the cerebral cortex of the dog. *Am J Physiol* 160:395-401.
- Valverde F (1983) A comparative approach to neocortical organization based on the study of the brain of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). In: Ramón y Cajal's Contribution to the Neurosciences (Grisolia S, Guerri C, Samson F, Reinoso-Suárez F, eds). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Valverde F (1986) Intrinsic neocortical organization: some comparative aspects. *Neuroscience* 18:1-23.
- Valverde F, López-Mascaraque L (1981) Neocortical endeavor: basic neuronal organization in the cortex of hedgehog. Eleventh International Congress of Anatomy: Glial and Neuronal Cell Biology:281-290.
- Valverde F, Facal-Valverde MV (1986) Neocortical layers I and II of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). I. Intrinsic organization. *Anat Embryol (Berl)* 173:413-430.
- Valverde F, De Carlos JA, López-Mascaraque L (2002) The Cerebral Cortex of Mammals: Diversity within Unity. In: Cortical Areas: Unity and Diversity (Schüz A, Miller R, eds). London und New York: Taylor and Francis.
- Valverde F, De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Donate-Oliver F (1986) Neocortical layers I and II of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). II. Thalamo-cortical connections. *Anat Embryol (Berl)* 175:167-179.
- Van Brederode JF, Mulligan KA, Hendrickson AE (1990) Calcium-binding proteins as markers for subpopulations of GABAergic neurons in monkey striate cortex. *J Comp Neurol* 298:1-22.
- Van De Werd HJ, Rajkowska G, Evers P, Uylings HB (2010) Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic characterization of the prefrontal cortical areas in the mouse. *Brain Struct Funct* 214:339-353.

- Van der Gucht E, Vandesande F, Arckens L (2001) Neurofilament protein: a selective marker for the architectonic parcellation of the visual cortex in adult cat brain. *J Comp Neurol* 441:345-368.
- Van der Gucht E, Burnat K, Arckens L (2004) Characteristic expression of neurofilament protein defines six cortical areas and several subcortical divisions in mouse visual system. *Soc Neurosci Abstr* 300:7.
- Van der Gucht E, Clerens S, Jacobs S, Arckens L (2005) Light-induced Fos expression in phosphate-activated glutaminase- and neurofilament protein-immunoreactive neurons in cat primary visual cortex. *Brain Res* 1035:60-66.
- Van der Gucht E, Hof PR, Van Brussel L, Burnat K, Arckens L (2007) Neurofilament protein and neuronal activity markers define regional architectonic parcellation in the mouse visual cortex. *Cereb Cortex* 17:2805-2819.
- Vickers JC, Dickson TC, Adlard PA, Saunders HL, King CE, McCormack G (2000) The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 60:139-165.
- Vogt BA, Vogt L, Farber NB, Bush G (2005) Architecture and neurocytology of monkey cingulate gyrus. *J Comp Neurol* 485:218-239.
- Vogt O (1910) Die myeloarchitektonische Felderung des menschlichen Stirnhirns. *J Psychol Neurol* 15:221.
- Von Bonin G, Bailey P (1961) Pattern of the cerebral isocortex. In: *Primatologia, Handbuch der Primatenkunde* (Hofer H, Schultz AH, Starck D, eds), vol 2, pp 1-42. Basel: S. Karger.
- Von Economo C (1925) Die fünf Bautypen der Großhirnrinde. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 16:260-269.
- Von Economo C, Koskinas GN (1925) Die Cytoarchitektonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen. Textband und Atlas mit 112 mikrophotographischen Tafeln. Wien: J. Springer.
- Walloe S, Eriksen N, Dabelsteen T, Pakkenberg B (2010) A neurological comparative study of the harp seal (*Pagophilus groenlandicus*) and harbor porpoise (*Phocoena phocoena*) brain. *Anat Rec (Hoboken)* 293:2129-2135.
- Welker W (1990) Why Does Cerebral Cortex Fissure and Fold? In: *Cerebral Cortex* (Jones EG, Peters A, eds), vol 8B, pp 3-136. New York und London: Plenum Press.
- Wells RS, Scott MD (2009): Common bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* ; In: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM (eds): *Encyclopedia of Marine Mammals*, ed 2. San Diego: Academic Press, pp 249–255.
- Werner L, Hedlich A, Winkelmann E, Brauer K (1979) Versuch einer Identifizierung von Nervenzellen des visuellen Kortex der Ratte nach Nissl- und Golgi-Kopsch-Darstellung. *J Hirnforsch* 20:121-139.
- White EL (1978) Identified neurons in mouse Sml cortex which are postsynaptic to thalamocortical axon terminals: a combined Golgi-electron microscopic and degeneration study. *J Comp Neurol* 181:627-661.
- White EL (1982) Quantitative studies of thalamocortical synapses with labelled pyramidal cells in mouse Sml cortex. *Soc Neurosci Abstr*:853.



- White EL (1989) Cortical circuits: synaptic organization of the cerebral cortex: structure, function, and theory. Basel: Birkhäuser.
- White EL, Hersch SM (1981) Thalamocortical synapses of pyramidal cells which project from Sml to Msl cortex in the mouse. J Comp Neurol 198:167-181.
- Wirz K (1954) Ontogenese und Cerebralisation bei Eutheria. Acta Anat (Basel) 20:318-329.
- Wonders CP, Anderson SA (2006) The origin and specification of cortical interneurons. Nat Rev Neurosci 7:687-696.
- Wong-Riley M (1979) Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. Brain Res 171:11-28.
- Wong P, Kaas JH (2009) Architectonic subdivisions of neocortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). Anat Rec (Hoboken) 292:994-1027.
- Woolsey CN, Fairman D (1946) Contralateral, ipsilateral, and bilateral representation of cutaneous receptors in somatic areas I and II of the cerebral cortex of pig, sheep, and other mammals. Surgery 19:684-702.
- Würsig B, Wells RS, Würsig M, Norris KS (1994) Population Structure. In: The Hawaiian Spinner Dolphin (Norris KS, Würsig B, Wells RS, Würsig M, Brownlee SM, Johnson CM, Solow J, eds), pp 122-140. Los Angeles: University of California Press.
- Zilles K (1987) Graue und weiße Substanz des Hirnmantels. In: Anatomie des Menschen (Leonhardt B, Tillmann B, Töndury G, Zilles K, eds), vol 3. Stuttgart und New York: Georg Thieme Verlag.

Die Abfolge der Zitate im Literaturverzeichnis richtet sich nach dem Alphabet. Bei mehreren Autoren richtet sich die Abfolge nach der Zahl derselben sowie nach dem Erscheinungsjahr und schließlich wiederum nach dem Alphabet.

## 8 Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank geht zuallererst an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Helmut A. Oelschläger, für die Überlassung dieses wunderbaren Themas. Seine Mischung aus freundlicher Betreuung, stetiger Förderung und immerwährender Motivation (wissenschaftlich wie persönlich), gepaart mit fundamentalen Wissen, haben sehr zum Gelingen der vorliegenden Dissertation beigetragen. Über die Jahre hat er es geschafft, mir als einem Mediziner die Gedankenwelt und Arbeitsweise eines Biologen nahezubringen.

Ebenso danken möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Stehle, Direktor des Instituts der Anatomie III der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, für die jahrelange freundliche Unterstützung dieses Projekts. Die angenehme Arbeitsatmosphäre in seinem Institut hat mich in schwierigen Phasen dieser Doktorarbeit immer wieder beflügelt. Insbesondere Frau Angelika Langhagen sei in diesem Zusammenhang für Ihre enorme Hilfe bei der Einarbeitung in die Immunhistochemie gedankt.

Weiter sei Prof. Dr. med. Ralf Galuske sowie Christine Zschau (beide Universität Darmstadt) für Ihre Hilfe bei der Anfertigung des Golgi-Materials gedankt.

Eine ebenso große Hilfe war das histologische Vergleichsmaterial aus der Sammlung des Naturmuseums und Forschungsinstituts Senckenberg (Frankfurt am Main). In diesem Zusammenhang möchte ich Herrn Dr. Gerhard Storch meinen herzlichen Dank aussprechen, desgleichen Herrn Prof. Dr. Milan Klima (Dr. Senckenbergische Anatomie) und Herrn Prof. Dr. Giorgio Pilleri (Courgeveaux, Switzerland).

Auch PD. Dr. Ursula Siebert (Universität Kiel) sowie Prof. Dr. Bruno Cozzi (Universität Padova, Italien) möchte ich für die Bereitstellung des überaus seltenen Delphin-Probenmaterials danken.

Frau Jutta S. Oelschläger sei an dieser Stelle für Ihre exzellente technische Hilfe bei der Erstellung und Ausarbeitung einiger Grafiken ganz herzlich gedankt.

Herrn Sefer Yildiz möchte ich für die tatkräftige Mitarbeit bei der Entnahme der Hirnproben danken.

Mein nachdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Patrick Hof, Leiter des Laboratory of Neuromorphology am Fishberg Department of Neuroscience der Mount Sinai School of Medicine in New York (N.Y., U.S.A.), für seine großzügige Unterstützung mit Rat und Tat während meines Aufenthaltes an seinem Institut. Seine Ideen und

Hilfestellungen waren für mich überaus wertvoll. Den Mitarbeitern des Departments of Neuroscience (vor allem Bridget Wicinski, Camilla Butti, Malin Hoistad sowie William Janssen) sei bei dieser Gelegenheit für die tolle Zusammenarbeit gedankt.

Daneben möchte ich Herrn Prof. Dr. Hilmar Stolte danken, dem Präsidenten der International Academy of Life Sciences (IALS), welche über das Biomedical Sciences Exchange Program (BMEP) meinen Forschungsaufenthalt in New York ermöglichte.

Ganz persönlich möchte ich mich bei meinen beiden Brüdern Harald und Michael Kern bedanken. Die Unterstützung der beiden war äußerst wohltuend.

Besonderer Dank gilt meiner Freundin Eva Rettinger. Ihr unerschütterlicher Zuspruch hat mir während Abfassung dieser Schrift sehr geholfen.

Mein größter und herzlichster Dank geht an meine Eltern Gabriele und Ludwig Kern. Über all die Jahre haben sie mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht; und meine Freude am universitären Schaffen geht letzten Endes auf sie zurück.

## 9 Lebenslauf und Ehrenwörtliche Erklärung

### Lebenslauf

#### **Persönliche Daten:**

Geburtsdatum/ -ort:	14. April 1982 in München
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

#### **Schulbildung:**

1988-1992:	Grundschule Ingolstadt-Gerolfing
1992-2001:	Christoph-Scheiner-Gymnasium Ingolstadt

#### **Studium:**

10/2002-11/2010	Studium der Humanmedizin an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt a.M.
09/2005:	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
08/2009-08/2010:	Praktisches Jahr
11/2010:	Ärztliche Prüfung

#### **Approbation:**

11/2010:	Approbation
----------	-------------

#### **Berufstätigkeit:**

seit 05/2011:	Assistenzarzt am Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung (ISD) der Universitätsklinik Großhadern in München
---------------	--

#### **Praktisches Jahr am Klinikum der J.W. Goethe-Universität Frankfurt a.M.:**

1. Tertial:	Zentrum der Inneren Medizin
2. Tertial:	Klinik für Neurologie
3. Tertial:	Zentrum der Chirurgie

#### **Forschungsstipendium im Rahmen der Promotion:**

09/2008-06/2009:	Biomedical Sciences Exchange Program (BMEP) der International Academy of Life Sciences (IALS) in Kooperation mit dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD): Mount Sinai School of Medicine, Dr. Arthur M. Fishberg Department of Neuroscience, New York, NY, USA.
------------------	--

## Publikationen:

---

**Kern A**, Seidel K, Oelschläger HHA (2009) The central vestibular complex in dolphins and humans: functional implications of Deiters' nucleus. *Brain Behav Evol* 73:102-110.

**Kern A**, Siebert U, Cozzi B, Hof PR, Oelschläger HHA: Stereology of the neocortex in odontocetes: qualitative, quantitative and functional implications. *Brain Behavior Evolution*. DOI: 10.1159/000323674.

## Kongresse:

- 
- |          |   |
|----------|---|
| 04/2007: | 5 <sup>th</sup> European Conference on Comparative Neurobiology, Paris. Abstract und Posterpräsentation:<br><b>Kern A</b> , Seidel K, Fung C, Rüb U, Oelschläger HHA:<br>"The central vestibular complex in the La Plata dolphin ( <i>Pontoporia blainvillei</i> )" |
| 03/2010: | 24 <sup>th</sup> Conference of the European Cetacean Society, Stralsund. Abstract und Vortrag:<br><b>Kern A</b> : "The harbour porpoise neocortex: stereological implications"  |

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

#### **Der Neokortex der Säugetiere – Evolution und Funktion**

im Institut der Anatomie III (Dr. Senckenbergische Anatomie) der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Helmut A. Oelschläger ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Darüberhinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Kern A, Siebert U, Cozzi B, Hof PR, Oelschläger HHA:

Stereology of the neocortex in odontocetes: qualitative, quantitative and functional implications.

Brain Behavior Evolution, DOI: 10.1159/000323674.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

## 10 Anhang

### 10.1 Liste der verwendeten Materialien

Abzugshaube:	<i>DURALAB</i> - Equipment Corporation, Brooklyn, NY, USA
Anatomische Klinge:	<i>Victorinox</i> <sup>®</sup> - Catalog no.: 455-14, R.H. Forschner Company, Schweiz
Bechergefäße:	<i>KIMAX</i> <sup>®</sup> <i>Kimble</i> (50 ml, 200 ml, 400 ml), Schott North America Inc., Elmsford, USA <i>PYREX</i> <sup>®</sup> (500 ml, 1000 ml, 4000 ml), Corning Inc., Corning, USA
Deckgläschen:	<i>Cover Glass No. 1, 24 x 60 mm</i> - catalog no.: 2935-246, Corning Inc., Corning, USA <i>Cover Glass No. 1, 48 x 60 mm</i> - catalog no.: 4860-1, Brain Research Laboratories, Newton, USA
Eppendorfgefäße :	<i>Easy Open Microtubes</i> (1,5 ml) - catalog no.: MH-815EZR (rot) oder MH-815EZY (gelb), Phenix Research Products, Hayward, USA
Gefrierschrank:	<i>Isotemp Plus Freezer</i> (- 20 °C), Fisher Scientific Co., Pittsburgh, USA
Heiz-Rührer:	<i>Stirrer / Hotplate</i> - Corning Inc., Lowell, USA
Kühlschrank:	<i>Isotemp Laboratory Refrigerator</i> (+ 4 °C), Fisher Scientific Co., Pittsburgh, USA <i>Isotemp Plus Freezer</i> (-20 °C), Fisher Scientific Co., Pittsburgh, USA
Kulturplatten:	<i>6 Well Cell Culture Cluster</i> - catalog no.: 3506, Corning Inc., Lowell, USA <i>12 Well Cell Culture Cluster</i> - catalog no.: 3512, Corning Inc., Lowell, USA <i>24 Well Cell Culture Cluster</i> - catalog no.: 3527, Corning Inc., Lowell, USA <i>48 Well Cell Culture Cluster</i> - catalog no.: 3548, Corning Inc., Lowell, USA
Micro-Pipetten:	<i>Sealpette</i> (5-50 µl), Jencons Scientific Inc., Bridgeville, USA <i>Oxford BenchMate</i> (10-100 µl), Nichiryo, Tokyo, Japan <i>Oxford BenchMate</i> (100-1000µl), Nichiryo, Tokyo, Japan
Mikrotom:	<i>Jung Histoslide 2000R</i> - Leica, Nussloch, Deutschland
Mikroskop:	<i>Olympus BH-2</i> - Olympus America Inc., Center Valley, USA
Objektträger:	<i>Fisherbrand</i> <sup>®</sup> <i>Colorfrost Microscope Slides 25 x 75 x 1 mm, Precleaned</i> - catalog no.: 22-214-320, Fisher Scientific Co., Pittsburgh, USA <i>Microscope slides 50 x 75 x 1,2 mm, frosted one end</i> - catalog no.: 5075-FR, Brain Research Laboratories, Newton, USA
Parafilm:	<i>PARAFILM</i> <sup>®</sup> <i>M, Laboratory film</i> - American National Can, Menasha, USA
PH-Meter:	<i>accumet BASIC</i> - catalog no.: AB 15, Fisher Scientific Co., Pittsburgh, USA
Pinsel:	<i>Red Sable</i> - Ted Pella Inc., Redding, USA
Pipettierhilfe:	<i>Accu-jet</i> <sup>®</sup> - Brand GmbH CoKG, Wertheim, Deutschland



Pipetten:	<i>Sealpette</i> <sup>®</sup> (0,5-10 µl) - Jencons, Finnland <i>Oxford Benchmate</i> <sup>®</sup> (10-100 µl) - Nichiryo, Japan <i>Pipetman</i> <sup>®</sup> (100-1000 µl) - Gilson, Frankreich <i>Falcon</i> <sup>®</sup> <i>Serological Pipet</i> (1-10 ml) – catalog no.: 357530, Cole-Parmer, Vernon Hills, USA
Pipetten-Spitzen:	<i>Fisherbrand</i> <sup>®</sup> <i>Redi-Tip General Purpose</i> (1-200 µl) - catalog no.: 21-197-8E, Fisher Scientific Co., Pittsburgh, USA <i>Fisherbrand</i> <sup>®</sup> <i>Redi-Tip General Purpose</i> (101-1000 µl) - catalog no.: 21-197-8A, Fisher Scientific Co., Pittsburgh, USA
Rasierklängen:	<i>Industrieklingen</i> - Apollo Herkenrath GmbH, Solingen, Deutschland
Scanner:	<i>Epson Perfection 2450 PHOTO</i> - Epson America Inc., Long Beach, USA
Schüttler:	<i>Orbital shaker</i> - Belco Biotechnology, Vineland, USA
Schraubdeckelgläser:	<i>Nalgene</i> <sup>®</sup> (60 ml, 125 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml), Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Tissue-Tek <sup>®</sup> :	<i>O.C.T. Compound Embedding Medium</i> - catalog no.: 4583, Sakura Finetek Inc., Torrance, USA
Transfer-Pipetten:	<i>SAMCO Transfer Pipets</i> - catalog no.: 232, Samco Scientific Corporation, San Fernando, USA <i>Pasteurpipetten</i> - catalog no.: 1-6157, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Leonberg, Deutschland
Vibratom:	<i>VT 1000 S</i> - Leica, Wetzlar, Deutschland
Waagen:	<i>Scout Pro</i> , Max 4000 g - Ohaus, Pine Brook, USA <i>U 3600</i> , Max 200 g - Sartorius, Göttingen, Deutschland <i>AB 54</i> , Max 51 g - Mettler-Toledo Inc., Columbus, USA
Wasserbad:	<i>Precision, Model 180</i> - Precision Scientific Inc., Minneapolis, USA
Wiegepapier:	<i>Weighing paper</i> - catalog no.: 09-898-12B, Fisher Scientific Co., Pittsburgh, USA

## 10.2 Liste der verwendeten Reagenzien

ABC-Kit:	<i>Vectastain</i> <sup>®</sup> <i>ABC-Kit (Elite) Standard</i> - catalog no.: PK-6100, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Agar:	<i>Agar</i> - catalog no.: 1016151000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid:	<i>Ammonium chloride</i> - catalog no.: 254134-25G, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Ammoniumnickel-	

sulfathexahydrat:	<i>Ammonium nickel (II) sulfate hexahydrate 98 %</i> - catalog no.: 18441, Avocado Research Chemicals Ltd., Heysham, UK
Chloroform:	<i>Chloroform</i> , ACS - catalog no.: 67-66-3, Alfa-Aesar, Ward Hill, USA
D-[+]-Glucose:	<i>D-[+]-Glucose</i> - catalog no.: G-6152, Sigma-Chemical Co., St. Louis, USA
D-Limonen:	<i>D-Limonene</i> - catalog no.: 100123, Aromachem Inc., Brooklyn, USA
D-L-Lysin:	<i>DL-Lysine, monohydrate, 98%+</i> - catalog no.: 200-740-6, Alfa-Aesar GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DAB-Kit:	<i>Peroxidase substrate Kit DAB</i> - catalog no.: SK-4100, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Diaminobenzidin:	<i>3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride</i> - catalog no.: D5637-5G, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Eindeckmedien:	<i>DPX<sup>®</sup> Mountant for histology</i> - catalog no.: 44581, Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland <i>Shandon Xylene Substitute Mountant<sup>TM</sup></i> - catalog no.: 1900233, Thermo Electron Corporation, Runcorn, UK
Eisessig:	<i>Acetic Acid Glacial</i> - catalog no.: 2504-1, Mallinckrodt Inc., Parts, USA
Ethanol:	<i>Ethyl alcohol</i> - catalog no.: 111000200, Pharmaca-Aaper Inc., Brookfield, USA <i>Ethanol</i> - catalog no.: 8187602500, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gelatine:	<i>Gelatin from porcine skin, Type A, 300 Bloom</i> - catalog no.: G2500-100G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glucose-Oxidase:	<i>Glucose Oxidase, Type VII, From Aspergillus niger</i> - catalog no.: G2133-10KU, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Iodessigsäure:	<i>Iodessigsäure</i> - catalog no.: 8-22282.0100, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchrom (III)-sulfat:	<i>Chromium (III) potassium sulfate</i> - catalog no.: 243361-100G, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA <i>Kaliumchrom (III)-sulfat</i> - catalog no.: 1010360250, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdichromat:	<i>Kaliumdichromat</i> - catalog no.: 727 A 250564, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kresylviolettacetat:	<i>Cresyl violet acetate, 5g</i> - catalog no.: 61123, Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Methanol:	<i>Methanol, histological grade</i> - catalog no.: A433 <sup>P</sup> -4, Fisher Scientific, Fair Lawn, USA
Natriumacetat:	<i>Sodium acetate</i> - catalog no.: S2889-250G, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Natriumazid:	<i>Sodium azide</i> - catalog no.: S8032-100G, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Natriumchlorid:	<i>Sodium chloride</i> - catalog no.: S9888-5KG, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA <i>Sodium chloride</i> - catalog no.: S271-3, Fisher Scientific, Fair Lawn, USA
Natriumcitrat:	<i>Sodium citrate</i> - catalog no.: S279-500, Fisher Scientific, Fair Lawn, USA
Natriumhypochlorit:	<i>101 Bleach, Regular</i> - catalog no.: 800-245-1942, James Austin Company, Mars, USA
Natriumperiodat:	<i>Sodium(meta)periodate</i> – catalog no.: S 1878-100G, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Natriumphosphat:	<i>Sodium phosphate monobasic</i> - catalog no.: S0751-3KG, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA <i>Sodium phosphate dibasic anhydrous</i> - catalog no.: 71640, Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natronlauge:	<i>Sodium hydroxide</i> - catalog no.: S5881-1KG, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Normalziegenserum:	<i>Goat Serum</i> - catalog no.: G9023-10ML, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Paraformaldehyd:	<i>Paraformaldehyde, Granular</i> - catalog no.: 19210, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Salzsäure:	<i>Hydrochloric Acid</i> – catalog no.: A144-500, Fisher Scientific, Fair Lawn, USA
Silbernitrat:	<i>Silbernitrat</i> - catalog no.: 1015150100, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sucrose:	<i>Sucrose</i> - catalog no.: S9378-5KG, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Thimerosal:	<i>Thimerosal</i> - catalog no.: 71230, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Tris:	<i>Trizma<sup>®</sup> BASE</i> - catalog no.: T-8404, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Triton:	<i>Triton<sup>®</sup> X-100</i> - catalog no.: X100-100ML, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid:	<i>Hydrogen peroxide solution 30 %</i> - catalog no.: H1009-100ML, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Xylol:	<i>Shandon Xylene Substitute<sup>™</sup></i> - catalog no.: 6764508, Thermo Electron Corporation, Runcorn, UK
Zitronensäure:	<i>Citric acid</i> - catalog no.: A940-500, Fisher Scientific, Fair Lawn, USA

## 10.3 Rezepte

### 1) Pufferlösungen

#### Phosphatpuffer (phosphate buffer, PB; pH 7,5; 0,01M; 1L)

- di-Natriumphosphat wasserfrei ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1,136	g
- mono-Natriumphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	0,276	g
- Aqua bidest	800	ml
- pH auf 7,5 einstellen mit NaOH oder HCl		
- Thimerosal	0,04	g
- Aqua bidest	ad 1	L

#### Phosphatpuffer-Saline (phosphate buffer saline, PBS; pH 7,5; 0,01M; 1L)

- Phosphatpuffer (PB)	1	L
- Natriumchlorid (NaCl)	9	g

#### Phosphatpuffer-Saline mit 0,1% Natriumazid (PBS-Azid; pH 7,5; 0,01M; 1L)

- Phosphatpuffer-Saline (PBS)	1	L
- Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	1	g

#### Natriumacetatpuffer (sodium acetate buffer, SAB; pH 6,0; 0,1 M; 1L)

- Natriumacetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ )	13,6	g
- Aqua bidest	800	ml
- pH auf 6,0 einstellen mit Natronlauge oder Salzsäure		
- Aqua bidest	ad 1	L

#### Tris-gepufferte Saline (tris buffered saline, TBS; pH 7,6; 0,01M; 1L)

- Tris ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )	1,2	g
- Natriumchlorid (NaCl)	9	g
- Aqua bidest	800	ml
- pH auf 7,6 einstellen		
- Thimerosal	0,04	g
- Aqua bidest	ad 1	L

#### Tris-gepufferte Saline mit 0,3% Triton (TBS-Triton; pH 7,6; 0,01M; 1L)

- Tris-gepufferte Saline (TBS)	997	ml
- Triton	3	ml

#### TBS-Triton mit 5% Normal-Ziegeserum (50ml)

- Tris-gepufferte Saline mit 0,3% Triton (TBS-Triton)	47,5	ml
- Normal-Ziegeserum (normal goat serum, NGS)	2,5	ml

#### Zitratpuffer (citrate buffer, CB; pH 8,0; 0,01M ; 100ml)

- Lösung A:		
- Zitronensäure	4,2	g
- Aqua bidest	20	ml
-Lösung B :		
- Natriumcitrat	14,7 g	
- Aqua bidest	500	ml
- Mischen von 1,8 ml Lösung A mit 8,2 ml Lösung B		
- pH auf 8,0 einstellen		
- Aqua bidest	ad 100	ml

#### Methanol mit 0,3% Wasserstoffperoxid (100 ml)

- Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	99	ml
- Wasserstoffperoxid 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1	ml

### 2) Fixationslösungen

#### Paraformaldehyd-Phosphatpuffer (2,6% PFA-PB; 1 L)

- Phosphatpuffer (PB)	1	L
- auf ca. 60 °C erhitzen		
- einige Tropfen Natronlauge begeben		
- Paraformaldehyd (PFA)	26	g
- Rühren bis Lösung klar		
- pH auf 7,2 bis 7,4 einstellen		
- Lösung anschließend filtrieren		

#### Paraformaldehyd-Phosphatpuffer (4,0% PFA-PB; 1 L)

- Phosphatpuffer (PB)	1	L
- auf ca. 60 °C erhitzen		
- einige Tropfen Natronlauge begeben		
- Paraformaldehyd (PFA)	40	g
- Rühren bis Lösung klar		
- pH auf 7,2 bis 7,4 einstellen		
- Lösung anschließend filtrieren		

### 3) Lösungen zur Kryoprotektion

#### PBS mit 0,1% Natriumazid und 10% Sucrose (PBS- 10% Sucrose- Azid; pH 7,5; 0,01M, 1L)

- Phosphatpuffer-Saline (PBS)	500	ml
- Sucrose	100	g
- Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	1	g
- Aqua bidest	ad 1	L

#### PBS mit 0,1% Natriumazid und 20% Sucrose (PBS -20% Sucrose-Azid; pH 7,5; 0,01M, 1L)

- Phosphatpuffer-Saline (PBS)	500	ml
- Sucrose	200	g
- Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	1	g
- Aqua bidest	ad 1	L

#### PBS mit 0,1% Natriumazid und 30% Sucrose (PBS-Azid-30% Sucrose; pH 7,5, 0,01M, 1L)

- Phosphatpuffer-Saline (PBS)	500	ml
- Sucrose	300	g
- Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	1	g
- Aqua bidest	ad 1	L

### 4) Gewebe-Einbettung

#### Agar (4,0%)

- Agar agar	4	g
- Aqua bidest	100	ml
- unter Rühren erhitzen bis Lösung klar		
- zur Gewebseinbettung abkühlen lassen		

### 5) Färbelösungen

#### Kresylviolett

- Kresylviolettacetat	1	g
- Aqua bidest	50	ml
- bei 37 °C über Nacht rühren		
- Aqua bidest	ad 400	ml
- Natriumacetat	0,2	g
- Aqua bidest	ad 500	ml
- pH mit Eisessig auf 3-3,5 einstellen		
- Filtern der Lösung		
- nach Gebrauch lichtgeschützt aufbewahren		

#### Kaliumdichromat (3,0%)

- Kaliumdichromat	3	g
- Aqua bidest	100	ml
- Lösung rühren bis klar		

#### Silbernitrat (0,7%)

- Silbernitrat	0,7	g
- Aqua bidest	100	ml
- Lösung rühren bis klar		

#### Silbernitrat (0,9%)

- Silbernitrat	0,9	g
- Aqua bidest	100	ml
- Lösung rühren bis klar		

#### Silbernitrat (1,0%)

- Silbernitrat	1	g
- Aqua bidest	100	ml
- Lösung rühren bis klar		

### *6) Objektträger-Beschichtung*

#### Reinigen der Objektträger:

Zunächst werden die Objektträger in drei aufeinanderfolgenden Schritten für jeweils 30 Sekunden in folgenden Lösungen gereinigt:

1. 1% Salzsäure in 70% Ethanol
2. Aqua bidest
3. 95% Ethanol

Danach werden die Objektträger über Nacht im Ofen bei ca. 40 °C getrocknet.

#### Beschichten der Objektträger:

Für eine 2%-ige Chromalaungelatine-Beschichtung werden die Objektträger nach ihrer Reinigung mit folgender Lösung beschichtet:

1. 1L Aqua bidest auf 60 °C erwärmen
2. Zugabe von 20 g Gelatine (60 Bloom)
3. Rühren bis Lösung vollständig klar
4. Zugabe von 2 g Kaliumchrom(III)sulfat
5. Filtern der Lösung

Die Objektträger werden ca. 30 Sekunden in diese Lösung getaucht und anschließend im Trockengestell im Ofen bei ca. 40 °C über Nacht getrocknet.